

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM



МЕТОДЫ ПРАКТИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ



A Biologist's Guide to

PRINCIPLES AND TECHNIQUES OF PRACTICAL BIOCHEMISTRY

Edited by
Bryan L. Williams, M. Sc., Ph. D.
and
Keith Wilson, B. Sc., Ph. D.

EDWARD ARNOLD,
LONDON, 1975

Contributors

David H. Burrin, B. Sc., Ph. D.	Principal Lecturer in Biochemistry, Lanchester Polytechnic, Coventry
Michael G. Davis, M. Sc., Ph. D.	Lecturer in Biochemistry, The Hatfield Polytechnic, Hatfield
Kenneth H. Goulding, M. Sc., Ph. D.	Senior Lecturer in Biochemistry, The Hatfield Polytechnic, Hatfield
Alwyn Griffiths, B. Sc., Ph. D.	Senior Lecturer in Biochemistry, Oxford Polytechnic, Oxford
M. Rosalind Jenkins, M. Sc., Ph. D.	Lecturer in Biochemistry, The Hatfield Polytechnic, Hatfield
Ivor Simpkins, B. Sc., Ph. D.	Senior Lecturer in Biochemistry, The Hatfield Polytechnic, Hatfield
Bryan L. Williams, M. Sc., Ph. D.	Principal Lecturer in Biochemistry, The Hatfield Polytechnic, Hatfield
Keith Wilson, B. Sc., Ph. D.	Principal Lecturer in Biochemistry, The Hatfield Polytechnic, Hatfield

МЕТОДЫ ПРАКТИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ

Редакторы Б. УИЛЬЯМС, К. УИЛСОН

Перевод с английского
под редакцией акад. С. Е. СЕВЕРИНА
и канд. биол. наук А. Д. ВИНОГРАДОВА

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»
МОСКВА 1978

В книге рассмотрены основные методы, применяемые в современной биохимии: центрифугирование, различные виды хроматографии, электрофореза и спектроскопии, радиоизотопная техника, электрохимические и манометрические методы. Описаны также общие методы биохимических исследований на целом животном, изолированных органах, срезах тканей, клеточных фракциях. Изложение методов дополнено сводными таблицами и схемами, позволяющими легко ориентироваться в материале.

Предназначена для биологов всех специальностей, использующих методы современной биохимии, для врачей, работающих в клинических лабораториях, студентов и преподавателей университетов, медицинских, педагогических и сельскохозяйственных институтов.

Редакция биологической литературы

© 1975, Bryan L. Williams and Keith Wilson
Edward Arnold

М $\frac{21005-126}{041(01)-78}$ 126—78

© Перевод на русский язык, «Мир», 1978

ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Предлагаемая вниманию советского читателя книга, написанная коллективом английских авторов, посвящена методам, используемым в биологической химии. Биологическая химия на всем протяжении своего развития была и по сей день остается экспериментальной наукой. Это означает, что успех любого исследования в области биохимии определяется главным образом правильным выбором экспериментального подхода к той или иной проблеме и грамотным использованием выбранных методических приемов. Многолетний опыт преподавания биологической химии показывает, что именно освоение методических приемов является наиболее трудной задачей, стоящей перед студентами, специализирующимися в этой области биологии, или научными сотрудниками других специальностей, использующими стандартные биохимические приемы в своей повседневной работе. При современном положении вещей, когда бурное развитие биохимии и молекулярной биологии постоянно меняет наши представления о процессах, происходящих в клетке, преподаватель биохимии едва успевает знакомить студентов с тем, что происходит в этой области знания, зачастую вынужденно оставляя в стороне вопрос о том, как были выполнены соответствующие эксперименты. В результате студент, получивший солидную подготовку в области физики, химии и биохимии, часто оказывается беспомощным при решении простейших задач, связанных с непосредственным проведением экспериментальной работы.

В биохимии используют практически все современные методы физико-химического анализа. В настоящее время нет недостатка в пособиях, содержащих полное описание этих методов. Трудности, с которыми сталкивается биолог, желающий ознакомиться с тем или иным физико-химическим методом, состоят обычно в недостаточной подготовленности читателя к форме изложения предмета. Формализованный язык описания таких, например, методов, как ЭПР-спектроскопия, аналитическая электрохимия, часто отпугивает начинающего научного работника, а применение аналитического метода без ясного понимания сущности происходящих процессов, во-первых, обедняет его возможности, а во-вторых, может привести к серьезным ошибкам при трактовке полученных результатов.

Из всего сказанного ясно, что для начинающего научного ра-

ботника-биохимика необходимы руководства по физико-химическим методам исследования, написанные специальным, привычным для него языком. Именно таким руководством и является предлагаемое вниманию читателя пособие. В небольшой по объему книге авторы дают описание практически всех методов анализа, применяемых в биохимии, причем главное внимание уделено именно практическому их применению. Теоретические основы каждого метода написаны языком, доступным для понимания читателя, не обладающего специальной подготовкой, и вместе с тем достаточным для осознанного применения того или иного экспериментального подхода. Настоящее пособие предназначено главным образом для студентов старших курсов, аспирантов и научных работников, желающих получить первые представления о методах современной биохимии и их возможностях. Для подробного ознакомления с тем или иным методом в конце каждой главы приведен список литературы. Редакторы сочли необходимым дополнить литературу, рекомендуемую авторами, изданиями на русском языке. Конечно, даже самое тщательное изучение материала, приведенного в настоящем пособии, принесет мало пользы без практической отработки методов биохимического анализа в лаборатории.

Книга окажется особенно полезной в качестве учебного пособия для студентов тех вузов, где прохождение практикумов по биохимии является необходимой частью учебной программы. Можно надеяться, что эта книга принесет пользу и многочисленным научным работникам, использующим методы современной биохимии, поскольку она содержит необходимый минимум сведений, без знания которого научная работа в области биологической химии немыслима.

Перевод книги выполнен Р. Л. Бирновой (гл. 1—3), канд. физ.-мат. наук Ю. Л. Любченко (гл. 5 и 6) и канд. биол. наук Е. В. Петушковой (гл. 4, 7 и 8).

*С. Е. Северин,
А. Д. Виноградов*

ПРЕДИСЛОВИЕ К АНГЛИЙСКОМУ ИЗДАНИЮ

Биологические науки охватывают огромную область знаний и широко представлены в литературе. Последние годы были весьма знаменательными для всех, кто имеет отношение к биологии, в том числе и для преподавателей, обучающихся студентов и аспирантов; с появлением целого ряда сложных аналитических методов биология перестала быть преимущественно описательной наукой, спасительным прибежищем для запутавшихся в числовых дебрях и выработала более конкретные подходы к изучению процессов, протекающих в живых организмах во всем их многообразии. Таким образом, произошел переход биологии, ранее ограничивавшейся рамками отдельных дисциплин с их сложной, особой в каждом случае терминологией, на качественно новую ступень, основанную на применении новых терминов и новых биохимических методов. Эта новая ступень развития отнюдь не умаляет роли традиционных подходов, а, наоборот, дополняет и развивает их. Благодаря тому что биохимические исследования становятся все более разнообразными и проводятся в сравнительном аспекте, биология вступает в новую фазу своего развития, не менее интересную и увлекательную, чем предыдущие, и при изучении живых организмов постоянно сосредоточивает свое внимание не только на рассмотрении отдельных явлений, но и на их взаимосвязи.

В условиях бурного информационного взрыва во всех областях биологии составление учебных курсов требует строгих критериев при отборе материала и решении вопроса о том, что же в каждом конкретном случае является самым важным, существенным. В настоящее время основу многих учебных курсов независимо от их направленности и дальнейшей специализации студентов-биологов составляет биохимия.

Биологи разных специальностей должны располагать всей совокупностью самых современных методов и приборов: овладение методом газожидкостной хроматографии или радиоизотопными методами может оказаться в равной степени полезным как для будущего биохимика, так и для будущего эколога. Студенты же зачастую знают о существовании того или иного метода лишь понаслышке и имеют весьма смутное представление о том, что лежит в его основе.

Настоящее пособие было написано для того, чтобы хотя бы частично удовлетворить потребность студентов разных биологических специальностей в доступном источнике информации. Цели удалось достичь, по крайней мере с нашими студентами, благодаря тому энтузиазму, с которым преподаватели отдела относятся к учебному процессу. Для меня было честью работать с ними и написать к данному изданию предисловие.

К. Томас

руководитель отделения биологических наук
Хэтфилдского политехнического института

ОТ СОСТАВИТЕЛЕЙ

Выдающиеся успехи в выяснении механизмов протекающих в клетке и субклеточных структурах процессов были достигнуты в значительной мере благодаря привлечению в биологию количественных физических методов. Современные учебные курсы по биологии составлены таким образом, что основной упор в них делается на биохимию; при этом считается, что студенты уже знакомы со сложными аналитическими методами. Однако зачастую студенты, не обладая достаточными знаниями по физике и математике, не понимают сущности этих методов и рассматривают сложную современную аппаратуру как «черные ящики», назначение, принцип действия и область применения которых им неизвестны. Часто студенты объясняют своим непониманием допущенные в лабораторных работах погрешности и ошибки.

При составлении учебных программ по биохимии преподавателям обычно приходится решать вопрос о выборе правильного соотношения между теоретическими и практическими аспектами биохимии, не выходя при этом за рамки отведенного для чтения лекций и проведения практических занятий времени. Основное внимание уделяется в этих случаях рассмотрению таких теоретических вопросов, как структура и функции молекул, пути метаболизма и проблемы энзимологии. Что касается практических аспектов биохимии, то даже когда их всестороннему освещению уделяется достаточно много времени, такой учебный курс может показаться студентам скучным, однообразным. Часто студенты-биологи посещают дополнительные лекции по физике, в которых излагаются принципы, лежащие в основе некоторых аналитических методов, однако, как правило, такие курсы читаются вне связи с задачами биологии.

Как мы убедились на собственном опыте, решить проблему всестороннего ознакомления студентов со всеми аспектами практической биохимии, рекомендуя им соответствующую литературу, невозможно. Существует множество учебников, в которых описаны отдельные биохимические методы, однако материал в них излагается чересчур подробно и рассчитан на научных работников и аспирантов-биохимиков, поэтому для студентов-биологов широкого профиля эти учебники, пожалуй, слишком сложны.

Мы попытались решить эту проблему, составив для наших студентов описание методов, применяющихся в практической биохимии, и обобщая и дополняя эти вопросы в лекциях, семинарах и лабораторных занятиях. Многочисленные консультации с преподавателями других политехнических институтов, университетов и колледжей убедили нас в правильности такого подхода и показали, насколько велика потребность студентов-биологов в руководстве, которое обобщило бы все наиболее часто применяемые методы.

Настоящее пособие, целью которого является изложение основ практической биохимии, было составлено с учетом этих требований. Оно не представляет собой ни фундаментальное научное исследование, ни сборник задач для студенческого практикума. Как известно, почти каждая кафедра биологии или биохимии располагает кругом практических задач, рассчитанных на определенный уровень студентов и составленных с учетом конкретных целей обучения и специфики данного учебного заведения. Вся практическая биохимия складывается из овладения целым рядом навыков; при составлении данного руководства мы полагали, что студенты уже овладели простейшими из них, как, например, умение пользоваться пипеткой.

При составлении данного пособия мы ставили перед собой следующие задачи:

а) подробно описать аналитические методы, применяемые в студенческих практикумах;

б) более кратко описать некоторые специальные методы (например, ЭПР- и ЯМР-спектроскопию, аналитическое центрифугирование, масс-спектрометрию и т. д.), которые обычно не применяются в студенческой практике, а освещаются в лекционных курсах;

в) сопроводить описание каждого метода теоретическим рассмотрением принципа, лежащего в его основе;

г) дать перечень существующей аппаратуры с описанием принципов ее работы, области применения, потенциальных источников ошибок, точности, а также преимуществ и недостатков;

д) изложить основные приемы проведения экспериментов и описать используемые при этом материалы;

е) коротко обсудить область применения каждого конкретного метода.

По содержанию книгу можно разделить на три части. В первой изложены некоторые общие принципы биохимического исследования: рассматривается водородный показатель среды (рН), способы его контроля и сохранения постоянства в опытах *in vitro* и его роль для биологических систем; здесь же рассмотрены уровни, на которых проводятся биохимические исследования — от целого организма до гомогенатов клеток. Вторая часть посвящена описанию различных методов разделения — центрифугированию (гл. 2), хро-

матографии (гл. 3) и электрофорезу (гл. 4). Много внимания уделяется особенностям препаративного и аналитического разделения. В конце этой части мы попытались помочь студентам при выборе того или иного метода разделения. Последняя часть посвящена описанию количественных и качественных аналитических методов, применяющихся при исследовании различных биологических систем. В гл. 5 рассматриваются спектроскопические методы, в гл. 6 — радиоизотопные, в гл. 7 — потенциометрические, электрометрические и полярографические методы, в гл. 8 — методы манометрии. В конце каждой главы дается список литературы, рекомендуемой для дополнительного чтения, в частности пособие «Методы биохимического анализа» (Methods of Biochemical Analysis) под редакцией Д. Глика, издательство Interscience, John Wiley and Sons, Ltd. Ввиду того что в основе многих методов лежат фундаментальные законы физической химии, мы рекомендуем также книгу проф. Г. Морриса из серии «Современная биология», «Физическая химия: руководство для биологов» (A Biologist's Physical Chemistry, Contemporary Biology series), в которой эти вопросы изложены более подробно.

Все величины, за исключением температуры, которая указывается в градусах Цельсия, приведены в единицах системы СИ. Сравнительная таблица единиц систем СГС и СИ приводится в самом начале книги. Для некоторых читателей многие величины, приведенные в единицах системы СИ, могут показаться несколько необычными; однако мы надеемся, что со временем мы к ним привыкнем.

Книга предназначена для преподавателей и студентов самых разных биологических специальностей — ботаников, зоологов, биохимиков, физиологов, фармакологов, фармацевтов, медиков и ветеринаров.

Мы хотим выразить свою глубокую признательность шести нашим коллегам, написавшим главы для этой книги, и поблагодарить их за плодотворные дискуссии. Мы также хотим выразить сердечную благодарность д-ру К. Гоулдингу за помощь, оказанную при редактировании, и многим другим коллегам, чьи советы были учтены нами при составлении данного пособия, а также всем, кто помогал нам при оформлении рукописи. Мы пользовались постоянной поддержкой и помощью д-ра П. Прайса из издательства Edward Arnold, Ltd., который терпеливо помогал нам преодолевать возникающие трудности и благодаря которому этот коллективный труд смог выйти в свет. Мы старались избегать возможных неточностей и чрезмерных упрощений, однако устранить все недоработки невозможно. Поэтому мы будем весьма признательны нашим читателям за указания на замеченные ошибки и неточности, а также за критические замечания и рекомендации, которые помогут нам в будущем при составлении подобных пособий.

И, наконец, мы хотим выразить свою признательность м-ру К. Томасу за интерес, проявленный к настоящему пособию, за ценные замечания и готовность написать к нему предисловие. Мы надеемся, что пособие окажется весьма полезным для студентов.

Хэтфилдский
политехнический
институт

Б. Уильямс

К. Уилсон

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ И ЕДИНИЦЫ СИСТЕМЫ СИ

Принятые сокращения

Аденозиндифосфат	АДФ
Аденозинтрифосфат	АТФ
2,5-бис-(<i>p</i> -хлорфенил)-1,1,1-трихлорэтан	ДДТ
Дезоксирибонуклеиновая кислота	ДНК
Молекулярный вес	мол. вес
Никотинамидадениндинуклеотид	НАД ⁺
и его восстановленная форма	НАД·Н
Никотинамидадениндинуклеотидфосфат	НАДФ ⁺
и его восстановленная форма	НАДФ·Н
Рибонуклеиновая кислота	РНК
Стандартная температура и давление	с. т. д.
Электродвижущая сила	э. д. с.
Электрон	е ⁻
Этилендиаминтетраацетат	ЭДТА

Единицы системы СИ (Международной системы единиц)

Физическая величина	Наименование	Обозначение
<i>Основные единицы</i>		
Длина	метр	м
Масса	килограмм	кг
Время	секунда	с
Электрический ток	ампер	А
Термодинамическая температура	кельвин	К
Количество вещества	моль	моль
<i>Производные единицы</i>		
Энергия	джоуль	Дж
Сила	ньютон	Н
Давление	паскаль	Па
Мощность	ватт	Вт
Электрический заряд	кулон	Кл

Физическая величина	Наименование	Обозначение
Электрическая разность потенциалов	вольт	В
Электрическое сопротивление	ом	Ом
Частота	герц	Гц
Напряженность магнитного поля	тесла	Т

Множители и приставки для образования десятичных и дольных единиц

Множитель	Приставка	Обозначение
10^6	мега	М
10^3	кило	к
10	дека	да
10^{-1}	деци	д
10^{-2}	санти	с
10^{-3}	милли	м
10^{-6}	микро	мк
10^{-9}	нано	н
10^{-12}	пико	п

Единицы объема

За единицу объема в системе СИ принят *кубический метр, м³*. Вместо обозначения литр употребляется *кубический дециметр*. Несмотря на то что термином *литр* по-прежнему широко пользуются, рекомендуется изъять это обозначение из научного языка и заменить его соответствующими эквивалентами:

$$1 \text{ литр (л)} = 1 \text{ дм}^3 = 10^{-3} \text{ м}^3$$

$$1 \text{ миллилитр (мл)} = 1 \text{ см}^3 = 10^{-6} \text{ м}^3$$

$$1 \text{ микролитр (мкл)} = 1 \text{ мм}^3 = 10^{-9} \text{ м}^3$$

Перевод общепринятых единиц в единицы системы СИ

Ангстрем ($\text{\AA}$)	$100 \text{ нм} = 10^{-10} \text{ м}$
Атмосфера (760 мм рт. ст. при с. т. д.)	$101\,325 \text{ Па}$
Гаусс (Гс)	10^{-4} Т
Градусы Цельсия ($^{\circ}\text{C}$)	$(t^{\circ}\text{C} + 273) \text{ К}$
Калория	$4,186 \text{ Дж}$
Кюри (Ки)	$3,7 \cdot 10^{10} \text{ с}^{-1}$
Эрг	10^{-7} Дж
Миллиметры ртутного столба	$133,322 \text{ Па}$

Некоторые физические постоянные в единицах системы СИ

Газовая постоянная (R)	$8,314 \text{ Дж К}^{-1} \text{ моль}^{-1}$
Постоянная Планка (h)	$6,63 \cdot 10^{-34} \text{ Дж} \cdot \text{с}$
Молярный объем идеального газа при 273 К и 101 325 Па	$22,41 \text{ дм}^3 \cdot \text{моль}^{-1}$

Часть I

ОБЩИЕ ВОПРОСЫ

В этой части рассмотрены основные положения и подходы, лежащие в основе биохимических экспериментов.

Глава 1

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ БИОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Введение

Основная задача биохимии — объяснить, как функционируют живые системы с точки зрения процессов, протекающих в клетках. Все клетки в организме находятся в состоянии динамической активности и подвергаются действию внутренних и внешних факторов, которые в свою очередь также постоянно изменяются. В процессе жизнедеятельности любая отдельно взятая клетка взаимодействует с другими клетками, находящимися как в непосредственной близости от нее (межклеточные взаимодействия), так и на некотором расстоянии (гормональные эффекты). Функционирование органеллы внутри клетки также в значительной степени зависит от активности других органелл и окружающей цитоплазмы. Ясно поэтому, что нельзя достаточно полно изучить живую клетку, если делать это в отрыве от целого организма.

Интенсивные исследования, расширяющие и углубляющие наши знания о многочисленных процессах, протекающих в живом организме, ведутся в области фармакологии, микробиологии, патологии и других наук. Биохимия изучает эти процессы главным образом на уровне клетки и клеточных структур, однако полученные результаты должны рассматриваться также на уровне органов, тканей, всего организма и даже во взаимосвязи организма с окружающей средой.

Изучение любой последовательности взаимосвязанных процессов, протекающих в какой-либо биологической системе, начинают, как правило, с изучения ее компонентов. Для этого компоненты обычно выделяют, всесторонне их исследуют и пытаются понять, как они функционируют в составе организма.

Процессы, характерные для целой клетки, протекают в отдельных клеточных частицах и органеллах, которые для анализа выделяют из клетки с помощью фракционирования. Этот процесс обычно состоит из двух этапов (разд. 1.10.3): сначала клетки разрушают, а затем из образовавшейся суспензии методом центрифугирования (гл. 2) выделяют нужные частицы и органеллы. Дальнейшее разделение индивидуальных компонентов клеточных частиц и органелл и изучение их свойств проводят с помощью центрифугирования (гл. 2), хроматографии (гл. 3) или электрофореза (гл. 4). Для определения состава, механизма действия и функций клеточных компонентов используются сложными количественными и качественными аналитическими методами. На атомном и молекулярном уровнях применяют целый ряд спектральных методов (гл. 5); механизм действия клеточных частиц и внутриклеточные взаимодействия изучают, используя одновременно несколько аналитических методов, таких, как спектроскопия (гл. 5) и радиоизотопные методы (гл. 6), потенциометрия, полярография (гл. 7) и манометрия (гл. 8).

При фракционировании нормальная активность клетки может в значительной степени нарушаться. Чтобы свести последствия фракционирования до минимума и приблизить условия к естественным, применяют особые приемы (разд. 1.10.1). Однако все побочные явления, возникающие в ходе фракционирования, устранить невозможно, поэтому полученные результаты следует трактовать весьма осторожно, особенно если речь идет о целой клетке, органе или организме.

1.2. рН среды и буферные растворы

1.2.1. Влияние рН на биологические процессы

Организмы и клетки, как правило, весьма устойчивы даже к значительным изменениям рН окружающей среды. Внутриклеточные процессы, наоборот, обладают высокой чувствительностью к рН и протекают в среде, рН которой строго регулируется (правда, некоторые колебания рН могут наблюдаться и внутри клетки, например у поверхности мембраны). Большинство внутриклеточных процессов протекает при нейтральных значениях рН, когда их скорость максимальна. Гидролазы лизосом, однако, обладают максимальной активностью при рН 5,0. Желудочный сок млекопитающих имеет весьма необычную величину рН — около 1; именно при этом рН активность фермента пепсина, начинающего переваривание белков пищи в желудке, максимальна.

В биологических системах постоянная величина рН поддерживается с помощью эффективных буферных систем, которые по своей химической природе таковы, что они препятствуют изменениям рН, возникающим в ходе метаболического образования

кислот (например, молочной кислоты) и оснований (например, аммиака). Большинство буферных систем, содержащихся в клеточных жидкостях, включают фосфаты, бикарбонат, аминокислоты и белки.

Чувствительность биологических процессов к рН обусловлена целым рядом причин. Ионы водорода могут выступать в качестве катализатора ряда процессов, быть реагентом или продуктом реакции. Кроме того, при изменении рН может измениться проницаемость клеточной мембраны, а следовательно, и распределение веществ или ионов по обе ее стороны. Подобно другим биологическим структурам, мембраны содержат способные к ионизации группы, и в зависимости от степени их ионизации меняется конформация, а значит и биологическая активность молекул, в которые эти группы входят. Это прежде всего касается белков, а следовательно, ферментов. В некоторых белках небольшое изменение рН окружающей среды вызывает проявление биологической активности. На примере гемоглобина, основной функцией которого является перенос кислорода от легких к тканям, можно видеть, что при активном тканевом дыхании незначительное понижение рН в тканях в результате образования углекислоты и ионов водорода облегчает высвобождение кислорода. Процесс высвобождения кислорода сопровождается связыванием протонов гемоглобином, что увеличивает буферную емкость системы.

При изучении метаболических процессов *in vitro* возникает необходимость в применении «нефизиологических» буферных растворов: направленное изменение рН может значительно облегчить изучение таких типов молекул, как аминокислоты, белки и нуклеиновые кислоты с помощью электрофореза и ионообменной хроматографии.

1.2.2. Буферные растворы для биологических исследований

Буферным называется такой раствор, который препятствует изменению концентрации ионов водорода при добавлении к нему кислоты или щелочи. Такое действие раствора называется *буферным*. Величину буферного действия характеризуют *буферной емкостью* β , равной количеству сильного основания, которое необходимо добавить для изменения рН раствора на одну единицу.

$$\beta = \frac{db}{d(\text{pH})},$$

где $d(\text{pH})$ — изменение рН раствора при добавлении db основания.

Обычно пользуются буферными растворами, состоящими из смеси слабой кислоты или основания и соли этой кислоты, например смеси уксусной кислоты и ацетата натрия (по номенклатуре

Брёнстеда и Лоури буферный раствор представляет собой смесь слабой кислоты и сопряженного с ней основания).

При добавлении к раствору слабой кислоты (НА) и ее соли (А⁻) ионов водорода последние нейтрализуются анионами соли, которые действуют в данном случае как слабое основание; гидроксильные ионы, наоборот, нейтрализуются кислотой. Отсюда следует, что буферная емкость раствора, составленного из данной кислоты и сопряженного с ней основания, максимальна в том случае, когда их концентрации равны, т. е. $pH = pK_a$ кислоты. Буферная емкость зависит также от общей концентрации раствора и отношения соль—кислота: чем выше концентрация раствора, тем больше его буферная емкость. Концентрация кислоты и соли в буферных растворах обычно бывает порядка 0,05—0,20 М, а достаточной буферной емкостью растворы обладают в области значений $pH = pK_a \pm 1$.

Буферы, применяемые для биологических исследований, должны удовлетворять ряду требований:

1. Обладать достаточной буферной емкостью в требуемом диапазоне значений pH.
2. Обладать высокой степенью чистоты.
3. Хорошо растворяться в воде и не проникать через биологические мембраны.
4. Обладать устойчивостью к действию ферментов и гидролизу.
5. pH буферных растворов должен как можно меньше зависеть от их концентрации, температуры и ионного или солевого состава среды.
6. Не оказывать токсического или ингибирующего действия.
7. Комплексы буфера с катионами должны быть растворимыми.
8. Не поглощать свет в видимой или ультрафиолетовой областях спектра.

К сожалению, этим требованиям удовлетворяют далеко не все буферные растворы. Так, фосфаты обладают способностью осаждать поливалентные катионы и во многих системах выступают в качестве метаболитов или ингибиторов; трис-буфер иногда оказывает токсическое или ингибирующее действие. До недавнего времени насчитывалось всего несколько буферов, pH которых лежит в важной для биохимии области 6,0—8,0 и которые удовлетворяют перечисленным выше требованиям. В последние годы, однако, появился целый ряд так называемых цвиттерийонных буферов типа ГЭПЭС и ПИПЭС. Некоторые наиболее распространенные буферы приведены в табл. 1.1. Для получения буферных растворов, применимых в широком диапазоне значений pH, используются смеси разных буферов. Например, буферы Мак-Ильвейна имеют pH с областью значений от 2,2 до 8,0 и приготавливаются из лимонной кислоты и двувалентного фосфорнокислого натрия.

Наиболее важной группой физиологических буферов являются белки. Благодаря большому количеству содержащихся в боковых

цепях аминокислот щелочных и слабокислых групп белки имеют очень высокую буферную емкость. Буферная емкость крови в основном определяется гемоглобином.

1.2.3. Зависимость ионизации аминокислот и белков от pH

Аминокислоты и белки — это наиболее важные в биологическом отношении соединения, поэтому необходимо знать, в какой степени изменение pH влияет на их физические свойства. За исключением пролина, химические формулы всех аминокислот, из которых синтезируются белки, можно записать в общем виде как $RCH(NH_2)COOH$. pK_a аминогруппы лежит в области 9,0—10,5, а карбоксильной группы — между 1,7 и 2,4.

Степень ионизации аминокислот в водных растворах зависит от pH и определяется уравнением Гендерсона—Хассельбальха.

Таблица 1.1

Значения pK_a некоторых соединений, являющихся главными компонентами буферных растворов

Кислота или основание	pK_a (при 25°C)
Уксусная кислота	4,75
Барбитуровая кислота	3,98
Угольная кислота	6,10; 10,22
Лимонная кислота	3,10; 4,76; 5,40
Глицилглицин	3,06; 8,13
ГЭПЭС ¹	7,50
Фосфорная кислота	1,96; 6,70; 12,30
ПИПЭС ²	6,80
Фталевая кислота	2,90; 5,51
Янтарная кислота	4,18; 5,56
Винная кислота	2,96; 4,16
Трис ³	8,14

¹ ГЭПЭС — N-2-оксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота.

² ПИПЭС — пиперазин-N-N'-ди(2-этансульфоновая кислота).

³ Трис — 2-амино-2-оксиметилпропан-1,3-диол.

Для слабой кислоты это уравнение имеет следующий вид:

$$pH = pK_a + \lg \frac{[\text{Основание}]}{[\text{Кислота}]} \quad (1.1)$$

Для слабого основания, имея в виду, что $pK_a + pK_b = 14$, можно записать:

$$pH = pK_a - \lg \frac{[\text{Кислота}]}{[\text{Основание}]} \quad (1.2)$$



Таким образом, при низких значениях pH аминокислота находится в катионной форме, а при высоких — в анионной. При некотором промежуточном значении pH аминокислота оказывается незаряженной и называется *цвиттерионом*. Было установлено, что в кристаллическом состоянии или после растворения в чистой воде такие аминокислоты существуют главным образом в виде цвиттерионов, что придает им свойства ионных соединений, а именно высокую точку плавления и кипения, хорошую растворимость в воде и плохую растворимость в таких органических растворителях, как эфир и хлороформ. Величина pH, при которой в водном растворе преобладает цвиттерион, называется *изоионной точкой*: число отрицательных зарядов, образующихся на молекуле в результате отщепления протонов, равно числу положительных зарядов, образующихся благодаря присоединению протонов. Для аминокислот эта величина приблизительно соответствует *изoeлектрической точке* (pI) — молекула не несет суммарного заряда и таким образом оказывается электрофоретически неподвижной. Численное значение pH для этого случая зависит от того, насколько сильной является кислота, и определяется следующим уравнением:

$$\text{pH} = \text{pI} = \frac{pK_{a_1} + pK_{a_2}}{2}.$$

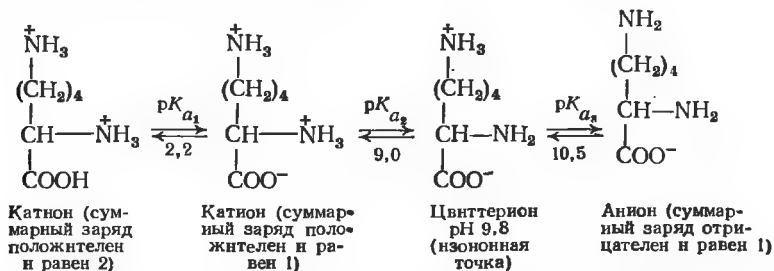
Для глицина величины pK_{a_1} и pK_{a_2} равны 2,3 и 9,6 соответственно; следовательно, изоионная точка равна 6,0. При более низких значениях pH в растворе содержатся и цвиттерион, и катион, а соотношение между ними определяется уравнением Гендерсона — Хассельбальха; при более высоких pH наряду с цвиттерионом в растворе находится анион.

Для так называемых «кислых» аминокислот, например, аспарагиновой кислоты, ионизация носит несколько иной характер. Это обусловлено наличием у них второй карбоксильной группы.



В этом случае рН, при котором в водном растворе преобладает цвиттерион, определяется величинами pK_{a_1} и pK_{a_2} .

Для лизина, который является «основной» аминокислотой, ионная точка определяется величинами pK_{a_2} и pK_{a_3} . Ионизация происходит следующим образом:



Вместо второй amino- или карбоксильной группы боковая цепь аминокислоты иногда содержит другую химическую группу, которая при определенном значении рН также ионизуется. К таким группам относятся фенольная (тирозин), гуанидиновая (аргинин), имидазольная (гистидин) и сульфгидрильная группа (цистеин). Ясно, что степень ионизации различных основных групп аминокислот при одном и том же рН будет различной. Более того, небольшие различия могут наблюдаться даже у одной и той же группы. Эти различия используют при электрофоретическом и ионообменном разделении смесей аминокислот, имеющихся, например, в белковом гидролизате.

Ионизация молекул белка качественно напоминает ионизацию аминокислот, но в количественном отношении отличается от нее благодаря наличию большого числа способных к ионизации групп. Белки образуются путем конденсации α -аминогруппы одной аминокислоты с α -карбоксильной группой соседней аминокислоты, поэтому, за исключением двух концевых аминокислот, все α -амино- и карбоксильные группы участвуют в образовании пептидных связей и в белке не ионизуются. Однако в боковых цепях присутствуют сотни amino- и карбоксильных групп, которые могут легко ионизоваться. Электростатическое притяжение, возникающее между некоторыми из этих групп, способствует стабилизации третичной структуры белковой молекулы, при этом молекулы белков часто бывают свернуты таким образом, что большинство способных к ионизации групп оказываются расположенными на поверхности молекулы, где они могут вступать во взаимодействие с окружающей средой. Естественно, что относительное число положительно и отрицательно заряженных групп в молекуле белка определяет те или иные ее физические свойства. У гистонов преобладают катионные группы, в то время как в других белках количество анионных и ка-

тионных групп либо одинаково, либо, напротив, преобладают анионные группы.

В отличие от аминокислот у белков изоионная точка обычно не совпадает с изоэлектрической. По определению изоионная точка — это такая величина pH , при которой молекула белка содержит равное число положительно и отрицательно заряженных групп, образовавшихся в результате связывания основных групп с протонами и соответствующей диссоциации кислотных групп. Изоэлектрическая точка — это pH , при котором белок электрофоретически неподвижен. При ее определении белок растворяют в буферном растворе. В этом растворе всегда содержатся низкомолекулярные анионы и катионы, способные связываться с многочисленными заряженными группами белка. В таких условиях наблюдаемое в изоэлектрической точке равновесие зарядов частично обусловлено их компенсацией связавшимися с молекулой белка анионами и катионами.

Молекулы белка всегда изучают в буферных растворах; при этом важно установить изоэлектрическую точку, поскольку, например, именно при этом значении pH создаются наиболее благоприятные условия для взаимодействия между противоположно заряженными группами соседних молекул, что ведет к их последующей агрегации и быстрому осаждению.

Агрегацию, а следовательно, и осаждение белковых молекул можно вызвать добавлением к раствору белка солей, например сульфата аммония. Молекулы белка и неорганические ионы при гидратации конкурируют за молекулы воды, и по достижении определенной концентрации соли взаимодействия белок — белок начинают преобладать над взаимодействиями белок — вода, что приводит к агрегации, а затем и осаждению белка. Этот метод широко применяется на начальных стадиях очистки белков. Различия в изоэлектрической точке разных белковых молекул используются при разделении белков с помощью электрофореза.

1.3. Подходы к биохимическому исследованию

Как мы уже говорили, активность клетки зависит от взаимодействия ее как с непосредственным окружением, так и с клетками, значительно удаленными от нее; кроме того, играет роль также и то, какие методы применяются для ее изучения. Поэтому чтобы получить наиболее полное представление о состоянии клеток внутри органов и тканей, опыты лучше всего проводить на интактных изолированных органах и тканях. Преимущество такого изучения заключается в том, что при этом удастся избежать нежелательных эффектов, обусловленных изменением непосредственного тканевого окружения, как это имеет место, например, при фракционировании

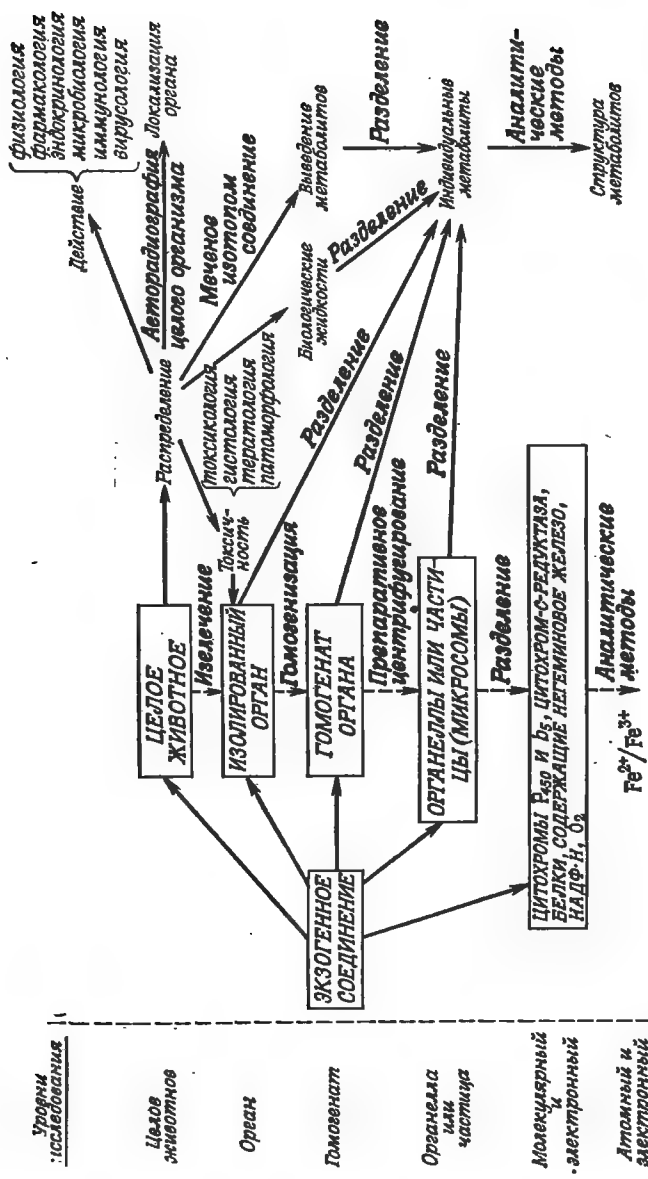


Рис. 1.1. Общая схема путей изучения действия и превращений введенного животному экзогенного соединения.

клеток. Исследование на уровне целых организмов не только не нарушает целостности тканей, но позволяет изучать отдельные органы и ткани, оставляя без изменения снабжение их питательными веществами, нервную и гормональную регуляцию и т. д. Таким образом, чтобы получить полную картину клеточного обмена, необходимо провести исследование на целом организме, изолированном органе, на уровне клетки, клеточной органеллы, на молекулярном и атомном уровнях.

На рис. 1.1 показаны пути биохимических подходов к изучению возможных превращений какого-либо экзогенного соединения (ксенобиотика) в организме животного или его действия на этот организм. Существуют два подхода, которые взаимно дополняют друг друга.

Первый из них заключается в том, что животному вводят соединение, а затем выделяют и идентифицируют все продукты, выводимые из организма. В других случаях спустя некоторое время после введения соединения животное умерщвляют, выделяют и фракционируют нужный орган или ткань, а затем изучают судьбу введенного соединения или исследуют его действие на интересующую субклеточную систему.

Второй подход состоит во введении соединения на одном из указанных на рис. 1.1 уровнях (т. е. в соответствующий изолированный орган, гомогенат, органеллу или субклеточную систему) и изучении действия этого соединения или путей его превращения на данном или более низких уровнях.

Действие какого-либо соединения можно исследовать на нескольких клеточных частицах или органеллах, каждую из которых необходимо для этого выделить из системы и подвергнуть анализу.

Зачастую исследуемое соединение представляет собой природный метаболит или входит в состав самого организма, а иногда является изотопом составного компонента организма. С другой стороны, не всегда действие какого-либо экзогенного соединения на функционирование организма представляет интерес для биохимика. В любом случае изучение можно проводить на любом из вышеуказанных уровней организации, а получаемые на каждом уровне результаты помогают составить более полное представление о процессах, протекающих в организме.

1.4. Исследования на уровне целого организма

Биохимические эксперименты на животных могут быть приняты с различными целями. Применяя в течение длительного времени специальную диету, лишенную определенных витаминов или микроэлементов, и одновременно регистрируя возникающие при этом физиологические и клинические изменения, можно иссле-

довать метаболическую роль данного витамина или микроэлемента. Вместе с тем, вводя животному какое-либо экзогенное соединение, можно изучать как влияние этого соединения на организм животного (фармакологическая или патологическая ответная реакция), так и влияние организма на введенное соединение, т. е. его превращения и выведение. В последнее время, главным образом благодаря созданию комитета Данлопа (ныне Комитет по безопасности применения лекарственных средств) после известной трагедии с талидомидом, все большее внимание стали уделять вопросам о том, каким образом различные лекарственные вещества, пищевые добавки и красители, а также такие соединения, как ДДТ, накапливаются в пище и метаболизируются, где они локализуются, какое разрушающее действие оказывают на органы и ткани и какие тератогенные и канцерогенные побочные эффекты могут вызывать.

Единственным способом исследовать пути превращения введенных соединений у человека является определение содержания этих соединений и их метаболитов в крови, моче, фекалиях, желчи, выдыхаемом воздухе, поте и слюне. О поражении органа судят по изменению содержания в сыворотке крови таких ферментов, как аспартат—аминотрансфераза и лактатдегидрогеназа. После введения соединений лабораторных животных умерщвляют, а затем исследуют изолированные органы.

Результаты, получаемые при анализе содержания каких-либо соединений и их метаболитов в биологических жидкостях и экскрементах живых организмов, в том числе и организма человека, зависят от многих взаимосвязанных факторов. К этим факторам относятся:

1. Способ введения соединения (перорально или путем внутривенной, внутримышечной, подкожной или внутривентрикулярной инъекции).

2. Скорость всасывания соединения в кровоток; если соединение вводят не внутривенно, то оно должно проникнуть (обычно путем пассивной диффузии) по крайней мере через одну мембрану (если соединение представляет собой слабый электролит, то оно должно пройти через мембрану в неионизованной форме).

3. Степень связывания соединения с сывороточным альбумином.

4. Кровоснабжение тканей.

5. Способность данного соединения проходить через мембраны и распределяться в межклеточных и внутриклеточных жидкостях.

6. Накопление соединения в жировой ткани и характер его связывания с нуклеиновыми кислотами и меланином.

7. Скорость метаболизма соединения (главным образом ферментной системой микросом печени).

8. Скорость выведения (с мочой и желчью).

Совокупность вышеперечисленных факторов создает характер-

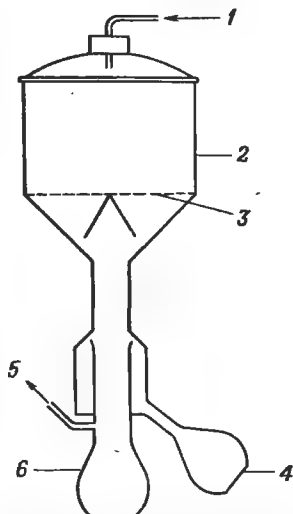
июю для данного соединения «фармако-кинетическую» картину. Помимо всего перечисленного, имеют значение также возраст, пол, режим питания, физические нагрузки, генетическое строение животного, а также время дня, когда животному было введено соединение (ввиду наличия у животных циркадного ритма). Оказалось даже, что превращение введенного соединения у животных, содержащихся в клетках с мягкими опилками, происходит быстрее, чем у животных, помещенных в клетки с жесткими опилками. Именно благодаря огромному многообразию переменных эксперименты всегда следует проводить не на одном животном, а на целых группах. Исследования нужно проводить на животных чистых линий, а получаемые экспериментальные данные подвергать тщательной статистической обработке. Результаты анализа фармакологического действия введенных экспериментальным животным соединений необходимо сопоставлять с данными, получаемыми в группе контрольных животных, которым было введено плацебо, т. е. совершенно нейтральное вещество, например лактоза.

Изучение метаболизма ксенобиотиков проводят на самых разных лабораторных животных — мышах, крысах, морских свинках (из-за их малой стоимости и простоты ухода за ними); наряду с ними для опытов используют также кроликов, кошек, собак и обезьян. Одной из основных проблем, стоящих перед биохимиками и фармакологами, является экстраполяция результатов, полученных на лабораторных животных, к человеку. Многочисленные сравнительные исследования показали, что метаболические процессы у человека и всех исследованных видов животных существенно различаются. Именно по этой причине новые лекарственные препараты, предназначенные для введения человеку, предварительно проходят испытание не на одном животном, а на целом ряде различных лабораторных животных. Только после тщательного сравнительного анализа полученных результатов клинические испытания можно проводить на человеке.

При изучении метаболизма ксенобиотиков удобнее всего вводить их в виде изотопных меток; как правило, вводят препараты, меченные по ^{14}C . Экскрецию у мелких лабораторных животных целесообразно изучать с помощью специальной метаболической стеклянной камеры, в которую животное помещают на все время опыта (рис. 1.2). Благодаря особой конструкции камеры моча и фекалии собираются отдельно, а выдыхаемый углекислый газ поступает в специальную ловушку. При изучении меченных по углероду соединений в клетку подается воздух, не содержащий углекислого газа, а выдыхаемый углекислый газ поглощается раствором гидроксида натрия; анализ выдыхаемого углекислого газа, меченного по углероду ($^{14}\text{CO}_2$), позволяет установить степень распада изучаемого соединения. Выделяемые с мочой и фекалиями вещества и их метаболиты связаны, как правило, с такими соединениями, как

Рис. 1.2. Метаболическая камера с сепаратором мочи и фекалий.

1 — воздух, не содержащий CO_2 ; 2 — камера; 3 — перфорированная подставка; 4 — сосуд для сбора мочи; 5 — отвод воздуха в ловушку с NaOH ; 6 — сосуд для сбора фекалий.



β -глюкуроновая кислота, глицин, глутатион и сульфат, что повышает растворимость метаболитов в воде, а следовательно, и степень их экскреции. Поэтому перед экстракцией метаболитов органическими растворителями (эфиром или хлороформом) пробы экскрементов нужно гидролизовать, предварительно исследовав их соответствующими аналитическими методами.

Одним из способов изучения путей превращения введенного соединения *in vivo* является перфузия органов (например, почек или печени), при которой соединение вводят с помощью тонкой полый иглы в артерию, несущую кровь к данному органу, а затем анализируют пробы крови, взятые из соответствующей вены животного.

В Англии существуют инструкции, ограничивающие применение живых позвоночных животных для исследовательских целей; контроль за выполнением этих инструкций осуществляется специальными комиссиями Внутреннего департамента (Министерства внутренних дел Великобритании). Эксперименты на живых позвоночных нельзя проводить без особого разрешения министерства, которое должно быть подписано профессором физиологии (или специалистом смежного профиля) и президентом Королевского общества или его заместителем.

Для изучения распределения введенного соединения животное спустя некоторое время после инъекции умерщвляют с помощью анестезии, декапитации или цервикальной дислокации. Затем проводят исследования либо трупа животного, либо отдельных органов, которые для этой цели изолируют, выявляют морфологические изменения, происшедшие в них, изучают их составные части.

Для получения наглядного представления о распределении введенных мелким лабораторным животным радиоактивных соединений успешно применяется метод автордиографии препаратов целого организма (разд. 6.2.4). Этот метод позволяет получить данные о распределении и относительном содержании введенного соединения в тканях животного, скорости его выведения и способности проникать сквозь биологические мембраны. Через определен-

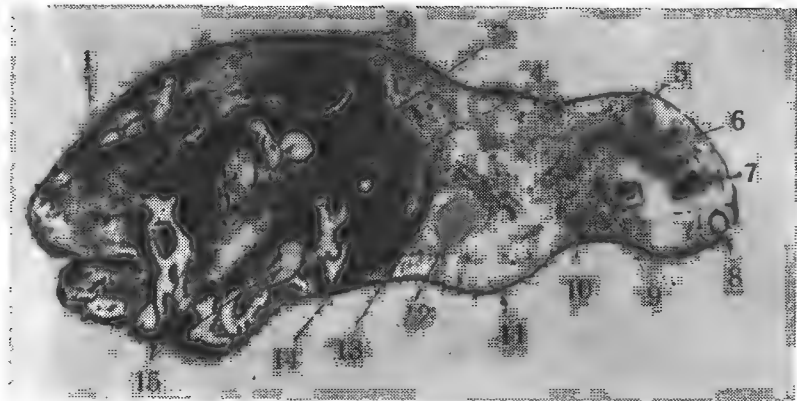


Рис. 1.3. Авторадиограмма целого организма мыши после введения ^{14}C -L-DOPA (с разрешения Roche Products Ltd., Welwyn Garden City).

Темная окраска указывает на присутствие в данном месте радиоактивного изотопа; концентрация его особенно высока в печени, поджелудочной железе, почках, коже и переднем мозге.

1 — мышцы; 2 — почка; 3 — поджелудочная железа; 4 — желудок; 5 — позвоночник; 6 — мозг; 7 — передний мозг; 8 — рот; 9 — гипофиз; 10 — слюнная железа; 11 — кожа; 12 — сердце; 13 — диафрагма; 14 — печень; 15 — кишечник.

ный промежуток времени после введения соединения животное умерщвляют с помощью анестезии и быстро замораживают смесью ацетона с твердым CO_2 при температуре -78°C или с помощью жидкого азота. Замороженное животное помещают при низкой температуре в водный раствор смолы (аравийская камедь), а после застывания смолы рассекают на соответствующем уровне резцом, прикрепленным к электродрели, или делают секционные срезы с помощью микротомы со специальным лезвием из карбида вольфрама. Полученный срез прикладывают к рентгеновской пленке и оставляют на 1—2 нед при низкой температуре, после чего пленку проявляют. Сопоставляя полученную авторадиограмму с цветным снимком среза, изучают распределение и локализацию введенного животного изотопа в различных его органах и тканях. Типичная авторадиограмма изображена на рис. 1.3.

1.5. Изотонические солевые растворы

При проведении экспериментов на органах животных, срезах растительных и животных тканей, гомогенатах и клеточных оргanelлах необходимо, чтобы среда для суспендирования имела не только определенный pH, но и заданный ионный состав. Среда должна быть *изотонической*, т. е. осмотическое давление в ней

должно совпадать с осмотическим давлением внутри клетки или клеточной органеллы, чтобы их метаболическая целостность не нарушалась. Кроме того, если, например, изучают рост клеток, среда для суспендирования должна содержать все необходимые основные питательные вещества. Это требование нужно особенно тщательно выполнять при изучении культур клеток и тканей, особенно культур животных клеток.

Существует целый ряд физиологических солевых растворов, многие из которых являются разновидностями одного из первых — раствора Рингера. К ним относятся растворы Тайрода, Янга, Лока, Менга и Да Жалона. Наиболее часто применяются фосфатный и бикарбонатный растворы Кребса—Рингера. По своему ионному составу бикарбонатный солевой раствор близок к сыворотке крови млекопитающих. Фосфатный раствор Кребса—Рингера не является физиологическим, но может с успехом применяться для изучения срезов и гомогенатов тканей в тех случаях, когда поглощение кислорода измеряют манометрическими методами (разд. 8.6.2). Большинство этих солевых растворов содержат в различных количествах NaCl , KCl , MgSO_4 , CaCl_2 , NaHCO_3 и KH_2PO_4 ; некоторые растворы насыщены смесью газов — кислорода и углекислого газа. Кроме того, в их состав могут входить такие соединения, как глюкоза, пируват, фумарат и оксалоацетат. Для исследования культур животных тканей используются растворы Хэнкса и Гей—Эрля. Выбор того или иного раствора вначале является произвольным и не основывается на объективных данных, поэтому перед его применением необходимо убедиться, что состав его оптимален. И, наконец, при проведении физиологических экспериментов нужно следить за тем, чтобы эффекты, наблюдаемые при изменении pH среды, были вызваны изменениями в концентрации ионов водорода, а не какими-либо другими изменениями буферного раствора.

1.6. Перфузия изолированных органов

Сущность этого метода заключается в том, что изучаемый орган (печень, почку или сердце) изолируют из организма животного и помещают в специальный термостатируемый прибор. Затем к перфузионной жидкости, которая обычно вводится в орган через артерию, добавляют исследуемое соединение и анализируют жидкость, вытекающую из органа через вену, что позволяет проследить за превращениями введенного соединения. Перфузионную жидкость можно пропускать через орган однократно или несколько раз, самотеком или с помощью небольшого насоса. Насос применяют тогда, когда перфузионную жидкость пропускают через орган многократно. В отдельных случаях жидкость прогоняют не при постоянном давлении, а импульсами, что позволяет приблизить условия опыта

к ситуации *in vivo* и имитирует процесс перекачивания крови сердцем.

Для проведения перфузии не обязательно полностью изолировать орган; ее можно проводить и на органе вскрытого анестезированного животного. При этом удается сохранить интактными нервные волокна и часть сосудистой системы.

Действие какого-либо соединения на ткань или орган (например, гистамина на мышцу) можно изучать по механической ответной реакции изолированной ткани на данное соединение. Исследуемое соединение добавляют к омывающей ткань жидкости; в ответ на это ткань, закрепленная с одного конца, а другим концом связанная с пером самописца, начинает двигаться, и любое движение ткани постоянно регистрируется на самописце. Данный метод позволяет изучать ответную реакцию изолированных органов на введение очень небольших (порядка нескольких нанограмм) количеств активных соединений.

Основным недостатком метода перфузии изолированных органов является отсутствие гормонального и нервного контроля; поэтому при экстраполяции всех полученных результатов к ситуации *in vivo* следует соблюдать осторожность.

1.7. Приготовление срезов органов и тканей

Срезы тканей желательно делать как можно тоньше, чтобы обеспечить свободный доступ кислорода в самые глубокорасположенные слои срезов и полное выведение продуктов распада за счет диффузии. Этим требованиям удовлетворяют срезы толщиной от 0,5 до 5 мм; кроме того, в этом случае соотношение между разрушенными и интактными клетками остается достаточно малым.

Исследуемый орган извлекают из организма сразу же после умерщвления животного, чтобы посмертные изменения были минимальными. Срезы делают с помощью лезвия бритвы или микротомы, затем переносят в сосуд с подходящей средой суспендирования и изучают их метаболизм и действие введенных соединений на обменные процессы. Тканевые срезы часто исследуют манометрическими методами (разд. 8.6.2); при этом, поскольку срезы бывают недостаточно тонкими, для создания аэробных условий и обеспечения кислородом глубокорасположенных слоев клеток приходится применять газовые смеси, содержащие до 95% кислорода. Недостатком данного метода является то, что внешние слои клеток срезов находятся в среде с токсической концентрацией кислорода.

1.8. Использование растительного материала

Выбор методов при изучении метаболизма у растений определяется в основном степенью организации растения. Одноклеточные и многоклеточные водоросли, например, хорошо растут на простых, чаще всего неорганических питательных средах при соответствующих внешних условиях. Такие водоросли можно рассматривать как интактные организмы; они имеют относительно простое строение и являются удобным экспериментальным материалом для изучения фундаментальных биохимических процессов, которые трудно исследовать на высокоорганизованных растениях. В качестве классического примера можно привести такие растительные организмы, как *Scenedesmus* и *Chlorella*, которые используются для изучения фиксации углекислого газа. Эти системы благодаря удобству контроля за их ростом и простоте поставки экзогенных соединений клеткам особенно удобны для изучения действия на обмен веществ таких факторов, как освещение, температура, питание и т. д.

На более высоких уровнях организации — у высших растений — доставка экзогенных соединений в соответствующий участок внутри растения в значительной степени затруднена. Если растение растет в почве, исследуемое соединение в виде раствора вносят в эту почву, откуда оно затем всасывается корнями. Другой способ состоит в том, что растение извлекают из почвы и корни помещают в раствор исследуемого соединения на определенный период времени. Раствором соединения можно опрыскивать растение или наносить его непосредственно на листья. Для изучения распределения соединения и его метаболитов внутри растительного организма исследуют отдельные его части — корни, побеги, листья, почки и цветы.

Основная трудность, возникающая при изучении метаболизма у растений, заключается в том, что в отличие от тканей животных растительные ткани не содержат достаточно крупных и сложных структур. Отдельные части растения можно изолировать, помещать в соответствующую среду, а затем изучать их метаболизм *in vitro*. Приготовление срезов, дисков, гомогенатов и выделение клеточных органелл из растительных тканей осуществляют такими же способами, как и из тканей животных.

1.9. Культуры тканей и клеток

Как мы уже говорили, изучение метаболизма на уровне организма или органа связано с целым рядом трудностей. Иногда это обусловлено еще и тем, что некоторые растения содержат очень мало живой ткани, например ткани меристемы, возникают также трудности доставки соединения в определенный участок растения и

контроля за ним. Поэтому выращивание тканей и клеток *in vitro* имеет ряд преимуществ. В соответствующих экспериментальных условиях можно изучать рост, деление и дифференцию клеток, при этом в значительной степени облегчается доставка соединений к клеткам и тканям и изучение их действия. *In vitro* можно выращивать большие количества той или иной ткани по сравнению с естественным содержанием ее в интактном организме.

Широкое использование данного метода в эволюционных, физиологических, общемедицинских и фармакологических исследованиях обусловлено тем, что культивирование клеток и тканей позволяет преодолевать многие физические, физиологические и биохимические ограничения, накладываемые сложным строением организма. Метод позволяет изучать потенциал развития клетки, т.е. способность клетки в пределах, обусловленных генотипом, образовывать при соответствующих химических и физических условиях любой другой тип клетки. Несмотря на то что культуры клеток растительных и животных тканей мало чем отличаются друг от друга, клетки растительных тканей могут размножаться в менее сложных средах, чем клетки тканей животных.

Культуры отдельных частей растения, например корня или меристемы, получают, помещая вырезанные части растения в стерильных условиях в питательную среду, поддерживающую их рост и развитие. В таких средах, которые бывают жидкими или полужидкими, можно выращивать также изолированные растительные и животные клетки. Питательные среды имеют довольно сложный химический состав; как правило, они содержат источник углерода (например, сахар), смесь неорганических солей, микроэлементы, витамины и факторы роста.

Часто в культуральные среды вносят сложные питательные добавки: к культурам животных клеток добавляют сыворотку крови, а к культурам растительных — кокосовое молоко. Чтобы обеспечить полную воспроизводимость данных, лучше всего там, где это возможно, пользоваться питательной средой постоянного состава. В подходящей среде в процессе роста и деления клеток образуются группы клеток, на которых и проводят исследование. Если культуру необходимо аэрировать (например, когда она представляет собой жидкую суспензию), коническую колбу или специальный сосуд с суспензией встряхивают или вращают. В тех случаях, когда требуется получить дезагрегированную суспензию, в раствор добавляют определенные ферменты, например трипсин к суспензии животных клеток или пектиназы к суспензии растительных.

Оценку клеточного роста на основе подсчета количества клеток и увеличения клеточного объема, позволяющих судить о размере клеток, удобнее проводить не в интактной ткани, а в клеточной суспензии. Соединение, внесенное в культуральную среду, поступает непосредственно в клетки, что позволяет легко проследить за

действием этого соединения на рост и обмен веществ в клетке. Применение этого метода для культивирования растительных клеток с удаленной внешней стенкой (культуры протопластов) и для поддержания роста вирусов еще более расширяет границы его использования.

Клеточные культуры широко используют в микробиологии для получения в большом количестве водорослей, грибов и бактерий для исследовательских целей. Для выращивания микроорганизмов применяют как жидкие, так и твердые среды; по своему химическому составу они, как правило, менее сложны, чем те, которые применяются для выращивания культур клеток животных и высших растений. Скорость роста микроорганизмов во много раз выше, чем скорость размножения других клеточных культур, поэтому поддерживать стерильность культур растительных и животных клеток чрезвычайно трудно — любое заражение культуры микробами приводит к быстрому инфицированию выращиваемой культуры.

Подобно другим методам *in vitro*, применение тканевых и клеточных культур ставит перед исследователями проблему экстраполяции полученных результатов к целому организму, особенно в тех случаях, когда при культивировании растительные и животные клетки дифференцируются.

1.10. Фракционирование клеток

Фракционирование клеток состоит из двух последовательных стадий — гомогенизации и разделения. На стадии гомогенизации структура ткани разрушается и ткань превращается в так называемый гомогенат. На второй стадии — разделения — происходит группирование отдельных компонентов гомогената по принципу общности их физических свойств, таких, как размер и плотность.

При идеальных условиях выделения внутриклеточные компоненты можно было бы получать в том же виде и количестве, в которых они существуют в интактных клетках, не нарушая таким образом их морфологической структуры и не изменяя их активности. Однако большинство существующих в настоящее время методов фракционирования всем этим требованиям не удовлетворяет, и при выборе того или иного метода часто приходится иметь в виду, что в ходе фракционирования за счет сохранения морфологической структуры клетки может нарушиться ее активность, и наоборот.

Выбор ткани для фракционирования определяется конкретными условиями эксперимента и объектом исследования. Ткани и клетки различных органов различаются по составу, хрупкости и плотности, что в свою очередь определяет выбор того или иного метода выделения. Печень, например, является идеальным объектом для изучения функционирования митохондрий, поскольку именно

в клетках печени митохондрии содержатся в особенно больших количествах. Ткань тимуса (зобной железы) чаще других тканей используется для выделения ядер, так как ядра тимоцитов составляют до 50% клеточной массы.

Клетки различных тканей обычно гетерогенны по форме и размерам; подобная гетерогенность точно в такой же степени характерна и для выделяемых из гомогенатов тканей субклеточных фракций. В этой связи химический анализ выделенных фракций может дать лишь усредненные данные о составе этих фракций. Различные органы животных отличаются друг от друга и по содержанию в них крови и соединительной ткани: чем больше соединительной ткани содержится в органе, тем хуже ткань поддается гомогенизации и тем труднее поэтому выделить из нее субклеточные компоненты.

1.10.1. Приготовление гомогенатов тканей и клеток

Гомогенизация приводит к потере морфологических и биохимических свойств, характерных для данной ткани. Такая потеря не существенна, если гомогенизация проводится как предварительная стадия выделения из ткани какого-либо химического соединения.

Однако в тех случаях, когда изучают метаболические процессы, морфологическая и биохимическая целостность ткани должна быть сохранена в максимальной степени. Целью гомогенизации, которая, к сожалению, по-прежнему остается эмпирическим методом, является разрушение тканей, клеточных стенок и (или) мембран и высвобождение клеточного содержимого. Для этого применяются самые разнообразные методы и приборы, хотя лежащие в их основе принципы не всегда ясны. Лишенная прочной теоретической базы и необходимого арсенала стандартных методов, гомогенизация представляет собой скорее искусство, чем науку. В силу того, что различные ткани в значительной степени отличаются одна от другой как по хрупкости определенных клеточных органелл, так и по устойчивости клеток и тканей к разрушению, при гомогенизации любого биологического материала всякий раз неизбежно возникают специфические проблемы, которые можно разрешить только путем проб и ошибок. В основном гомогенизация применяется как стадия, предшествующая разделению клеточных компонентов, которая дает возможность установить внутриклеточную локализацию метаболических процессов. Гомогенаты успешно используются и при изучении поглощения и метаболизма соединений в тех случаях, когда доставка их в интактные клетки затруднена в силу недостаточной проницаемости мембран.

1.10.2. Выбор среды суспендирования

Объективных критериев для выбора той или иной среды суспендирования при гомогенизации не существует. Некоторые рекомендации можно почерпнуть из литературы, однако окончательный выбор всегда зависит от результатов предварительных опытов с применением различных сред.

Обычно для создания в среде необходимого осмотического давления, предохраняющего частицы от набухания и разрыва, применяют сахарозу. Если сахароза затрудняет исследование свойств ферментов, ее заменяют маннитом. Существует целый ряд индивидуальных прописей по сохранению целостности частиц и защите ферментов от инактивации. Рекомендуемые растворы различаются по концентрации сахарозы или присутствию таких веществ, как ЭДТА, глутатин, β -меркаптоэтанол и т. д. Иногда вместо солевых растворов используют неионные среды, так как, например, в гомогенатах печени солевые растворы вызывают агглютинацию полиморфно-ядерных лейкоцитов и органелл. При работе с гомогенатами селезенки, наоборот, сахароза (0,25 М) обладает более выраженным агглютинирующим действием, чем KCl (0,2 М).

Для выделения ядер и хромосом пользуются лимонной кислотой, которая обладает способностью подавлять активность «нейтральных» дезоксирибонуклеаз.

Для выделения ядер применяют растворы глицерина и этиленгликоля, а для выделения пластид из клеток растений — карбоваксы (полимеры этиленгликоля). Хлоропласты обычно выделяют в средах, содержащих не сахарозу, а маннит и сорбит.

Анализ ферментов в растительных экстрактах иногда значительно усложняется в силу того, что в процессе гомогенизации выделяется большое количество фенолов, которые образуют водородные связи с карбонильными группами, участвующими в образовании пептидных связей белков, а это, по-видимому, вызывает инактивацию многих ферментов. Во избежание этого к экстрактам добавляют поливинилпирролидон, образующий с фенолами нерастворимый комплекс, который затем удаляют из экстракта фильтрованием.

Для выделения субклеточных органелл можно применять неводные среды. Суспендирующая среда в этом случае представляет собой смесь легкого и тяжелого органических растворителей, например смесь эфира с хлороформом или бензола с четыреххлористым углеродом. Плотность среды можно изменять таким образом, чтобы при последующем центрифугировании исследуемые частицы либо всплывали на поверхность, либо осаждались. «Неводное» фракционирование применяют для выделения хлоропластов и лейкоцитов, а также гранул гемосидерина из селезенки. Недостатками этого

метода являются нарушение морфологической структуры некоторых видов ткани и инактивация отдельных ферментов органическими растворителями.

1.10.3. Способы разрушения тканей и клеток

Для разрушения клеток чаще всего применяют физические методы. Большинство животных клеток разрушается сравнительно легко, однако при разрушении растительных и бактериальных клеток зачастую приходится сталкиваться со значительными трудностями, связанными с наличием клеточных стенок. Физические методы разрушения клеток подразделяются в зависимости от того, происходит ли оно под действием сил трения между клетками и твердыми веществами (растирание клеток с твердыми материалами) или гидродинамически (разрушение клеток в жидких средах).

Растирание клеток с твердыми материалами. В современной модификации этот метод состоит в растирании клеток с песком или абразивным порошком в ступке при помощи пестика. В настоящее время благодаря появлению более мягких способов разрушения этот метод применяется для разрушения животных клеток довольно редко, однако им по-прежнему пользуются для разрушения растительных и бактериальных клеток. Желательно, чтобы абразивные частицы были как можно более острыми и имели такой же размер, что и разрушаемые клетки. Недостаток метода заключается в том, что при разрушении клеток может нарушаться структура наиболее крупных органелл, таких, например, как хлоропласты.

Хорошие результаты дает продавливание клеток, смешанных с абразивными частицами, через пресс Хьюза. Влажные клетки с абразивными частицами помещают в трубку при температуре около -5°C , а затем однократным ударом по поршню, создающим скачкообразное изменение давления, проталкивают клеточную массу через узкое отверстие диаметром около 0,25 мм. Модификацией этого метода является продавливание клеток при температуре -25°C ; роль абразивных частиц выполняют в этом случае кристаллы льда. Чтобы добиться максимального разрушения бактериальных клеток, приходится иногда повышать давление до $5,5 \cdot 10^7$ Па.

Клетки бактерий можно разрушать также и путем механического встряхивания суспензий частиц с абразивным порошком с частотой 300—3000 колебаний в минуту при помощи встряхивателя Микля, в который добавляются мелкие стеклянные бусинки диаметром от 50 до 500 мкм. Однако возникающая при встряхивании сильная вибрация часто вызывает разрушение клеточных органелл.

Разрушение клеток в жидких средах. Разрушение клеток, находящихся в суспензии, происходит либо при вращении лопастей

или поршня (блендеры), либо при поступательном движении вверх и вниз поршня или шаров (гомогенизаторы).

Блендеры, как правило, имеют режущие лопасти, вращающиеся с большой скоростью. Количество и конструкция этих лопастей бывают разными, но все они обычно заострены под прямым углом друг к другу, а форма их обеспечивает хорошее перемешивание содержимого сосуда. Суспензию клеток помещают в специальный стакан, который имеет по всей высоте раструбы и в поперечном сечении выглядит как клеверный лист. Для поддержания низкой температуры в процессе гомогенизации стакан помещают в лед. Благодаря особому расположению лопастей и конструкции стакана в ходе фракционирования возникают гидродинамические силы. Метод достаточно универсален и широко применяется для фракционирования клеток, однако следует иметь в виду, что при быстром вращении лопастей гомогенизаторов возникают некоторые нежелательные эффекты.

Большинство гомогенизаторов представляют собой прибор, состоящий из пестика с ручным (гомогенизаторы Даунса и Тенбрэка) или механическим (гомогенизатор Поттера—Эльвегёйма) приводом, который вращается или движется вверх и вниз в стеклянном цилиндрическом сосуде. Необходимо следить за тем, чтобы зазор между пестиком и стенками сосуда оставался постоянным, так как скорость разрушения клеток зависит не только от скорости вращения пестика, но и от соотношения между радиусами пестика и сосуда. Сосуд закрепляется неподвижно, поэтому скорость вращения суспензии изменяется от минимальной у его стенок до максимальной у поверхности пестика; следовательно, чем меньше расстояние между этими поверхностями, тем выше градиент скорости. Возникающие при высоких скоростях силы достаточны для разрушения довольно тонких мембран животных клеток; растительные и бактериальные клетки при этом не разрушаются.

Эффективность гомогенизации в значительной степени зависит от наличия в измельчаемом материале сосудистой и соединительной ткани, для удаления которой ткань перед гомогенизацией пропускают через специальную мясорубку с отверстиями диаметром $0,88 \text{ мм}^2$.

Полиморфоядерные лейкоциты разрушаются более мягкими методами — при помощи пипетки. Эозинофилы разрушают путем быстрого пропускания под давлением через мелкорешчатое сито.

Разрушение клеток с помощью высокого давления. Этот метод применяется в основном для разрушения микробных клеток. Для этой цели используются специальными прессами, например френч-прессом (French Pressure), в котором создается давление до $10,4 \cdot 10^7 \text{ Па}$.

Суспензию клеток загружают в камеру из нержавеющей стали (рис. 1.4) при закрытом положении игольчатого клапана, посред-

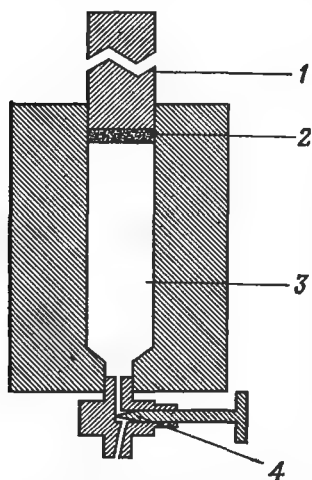


Рис. 1.4. Камера высокого давления.
1 — поршень; 2 — резиновая прокладка; 3 — камера;
4 — игольчатый клапан.

ством которого камера сообщается с внешней средой. Затем камеру переворачивают, открывают клапан и поршнем вытесняют из камеры воздух, после чего клапан снова закрывают, а камеру возвращают в исходное положение и устанавливают на неподвижном основании. С помощью гидравлического пресса создается требуемое давление на поршень; по достижении в камере определенного давления игольчатый клапан немного открывается, давление в камере несколько уменьшается, и в этот момент клетки лопаются. Вытекающую из выходного отверстия камеры клеточную массу собирают при открытом положении игольчатого клапана, поддерживая в камере постоянное давление. К сожалению, неизвестно, какие именно силы возникают в камере и как им противостоят клетки и клеточные компоненты.

Разрушение с помощью ультразвука. Клетки можно разрушить также с помощью высокочастотных ультразвуковых колебаний. Механизм такого разрушения окончательно не выяснен, однако установлено, что при обработке клеточных суспензий ультразвуком в среде создается высокочастотное изменение давления. Основным недостатком данного метода является то, что в процессе обработки ультразвуком выделяется значительное количество тепла. Чтобы избежать разогревания, сосуд с суспензией помещают в лед; конструкция сосуда такова, что жидкость непрерывно циркулирует и охлаждается у стенок. Некоторые сосуды помещают в холодильные камеры; однако далеко не всегда удастся устранить местное нагревание.

Прочие методы. К ним относятся: разрушение клеток методом осмотического шока, переваривание клеточных стенок ферментами, например лизоцимом, и сложными ферментными препаратами, выделенными из улиток и содержащими целлюлазу, хитиназу и липазу. Для разрушения клеток некоторых видов успешно применяют замораживание и оттаивание, автолиз и обработку органическими растворителями, такими, как этилацетат и толуол.

Как мы уже говорили, в большинстве случаев разрушение клеток сопровождается выделением тепла. Ввиду того что при высоких температурах многие ферменты инактивируются, все процедуры по разрушению клеток и выделению клеточных органелл следует

проводить при пониженных температурах. Для этого все работы проводят в холодных комнатах при температуре около 0°C или охлаждают клеточные суспензии с помощью льда. Следует отметить, что некоторые ферменты неустойчивы к холоду и при охлаждении также теряют свою активность.

При гомогенизации разного рода биологических тканей возникает множество частных проблем, которые разрешаются в основном путем проб и ошибок. Достаточную воспроизводимость результатов можно получить лишь при тщательном контроле за такими параметрами, как температура, продолжительность и скорость разрушения клеток, а также применяемое рабочее давление. Идеальным считается такой гомогенат, который легко поддается дальнейшему фракционированию.

1.11. Рекомендуемая литература

- Allfrey V.*, Isolation of subcellular components. In the Cell, Vol. I. Ed. by Brachet, J. and Mirsky, A. E. Academic Press, London, 1959. (Подробное описание сред суспендирования и методов гомогенизации.)
- Bourne G. J.*, In vivo Techniques in Histology. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1967. (Подробное описание методов с применением микроэлектродов.)
- Dawson R. M. C., Elliot D. C., Elliot W. H., Jones K. M.* (eds), Data for Biochemical Research, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge, 1969. (Подробное описание буферных растворов.)
- Morris J. G.*, A Biologist's Physical Chemistry, 2nd edn. Contemporary Biology Series. Edward Arnold, London, 1974. (pH, сила кислот и оснований и буферное действие.)
- Paul J.*, Cell and Tissue Culture, 3rd edn. E. & S. Livingstone, Edinburgh, 1965. (В книге освещаются все аспекты культивирования растительных и животных тканей.)
- Ross B. D.*, Perfusion Techniques in Biochemistry — a Laboratory Manual. Clarendon Press, Oxford, 1972. (Практическое руководство по использованию метода перфузии и изолированных органов в биохимической практике.)
- Staff of the Department of Pharmacology, University of Edinburgh, Pharmacological Experiments in Isolated Preparations, 2nd edn. E. & S. Livingstone, Edinburgh, 1970. (Подробное описание состава физиологических солевых растворов.)

Дополнительная литература

- Ленинджер А.*, Биохимия, пер. с англ., изд-во «Мир», М., 1974.
- Диксон М., Узбб Э.*, Ферменты, пер. с англ., ИЛ, М., 1961.
- Узбб Л.*, Ингибиторы ферментов и метаболизма, пер. с англ., изд-во «Мир», М., 1966.
- Мешкова Н. П.*, Физико-химические методы исследования в биологии, изд-во Московского университета, 1975.

Часть II

МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ

В этой части рассмотрены принципы, которые лежат в основе разделения клеточных органелл и частиц (центрифугирование) и способы их очистки (хроматография и электрофорез). Некоторые из этих методов применяются в основном при препаративном разделении, другие с успехом используются в аналитических целях. В приложении даны рекомендации по выбору того или иного метода разделения.

Глава 2

ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

2.1. Принцип метода

Разделение веществ с помощью центрифугирования основано на разном поведении частиц в центробежном поле. Суспензию частиц, помещенную в пробирку, загружают в ротор, установленный на валу привода центрифуги. В центробежном поле частицы, имеющие разную плотность, форму или размеры, осаждаются с разной скоростью.

Скорость седиментации зависит от *центробежного ускорения* (G), прямо пропорционального угловой скорости ротора (ω , в рад·с⁻¹) и расстоянию между частицей и осью вращения (r , в см):

$$G = \omega^2 r.$$

Поскольку один оборот ротора составляет 2π радиан, угловую скорость ротора в оборотах в минуту (об·мин⁻¹) можно записать так:

$$\omega = \frac{2\pi \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}}{60},$$

а центробежное ускорение тогда будет равно

$$G = \frac{4\pi^2 (\text{об} \cdot \text{мин}^{-1})^2 r}{3600}.$$

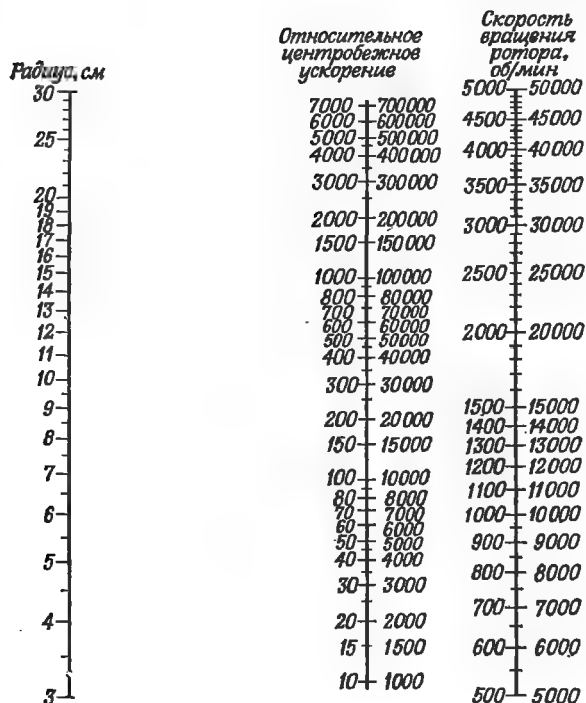


Рис. 2.1. Номограмма для расчета центробежного ускорения.

Для определения G соединяют прямой линией значения радиуса и скорости вращения ротора на крайних шкалах; точка пересечения этой прямой со средней шкалой дает искомую величину центробежного ускорения. Следует иметь в виду, что правая колонка цифр шкалы G соответствует правой колонке цифр шкалы скорости вращения ротора; левая —

Центробежное ускорение обычно выражается в единицах g (гравитационная постоянная, равная $980 \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$) и называется *относительное центробежное ускорение* (ОЦУ), т. е.

$$\text{ОЦУ} = \frac{4\pi^2 (\text{об} \cdot \text{мин}^{-1})^2 r}{3600 \cdot 980},$$

или

$$\text{ОЦУ} = 1,11 \cdot 10^{-5} (\text{об} \cdot \text{мин}^{-1})^2 r. \quad (2.1)$$

При перечислении условий разделения частиц указывают скорость вращения и радиус ротора, а также время центрифугирования. Центробежное ускорение обычно выражают в единицах g , рассчитанных из среднего радиуса вращения ($r_{\text{средн}}$) столбика жидкости в центрифужной пробирке (т. е. расстояния от оси вращения до

середины столбика жидкости). На основании уравнения (2.1) Доулом и Котциасом была составлена номограмма (рис. 2.1), выражающая зависимость ОЦУ от скорости вращения ротора и радиуса r .

Скорость седиментации сферических частиц зависит не только от центробежного ускорения, но и от плотности и радиуса самих частиц и от вязкости среды суспендирования. Время, необходимое для осаждения сферической частицы в жидкой среде от мениска жидкости до дна центрифужной пробирки, обратно пропорционально скорости седиментации и определяется следующим уравнением:

$$t = \frac{9}{2} \frac{\eta}{2\omega^2 r_q^2 (\rho_q - \rho)} \ln \frac{r_d}{r_m}, \quad (2.2)$$

где t — время седиментации в секундах, η — вязкость среды, r_q — радиус частицы, ρ_q — плотность частицы, ρ — плотность среды, r_m — расстояние от оси вращения до мениска жидкости, r_d — расстояние от оси вращения до дна пробирки.

Как следует из уравнения (2.2), при заданной скорости вращения ротора время, необходимое для осаждения гомогенных сферических частиц, обратно пропорционально квадрату их радиусов и разности плотностей частиц и среды и прямо пропорционально вязкости среды. Поэтому смесь гетерогенных, приблизительно сферических частиц, различающихся по плотности и (или) размерам, можно разделить либо за счет разного времени осаждения их на дно пробирки при данном ускорении, либо за счет распределения седиментирующих частиц вдоль пробирки, устанавливающегося через определенный промежуток времени. При разделении веществ необходимо учитывать и такие важные факторы, как плотность и вязкость среды. Описанными методами можно разделять клеточные органеллы из гомогенатов тканей. Основные компоненты клетки осаждаются в следующей последовательности: сначала целые клетки и их фрагменты, затем ядра, хлоропласты, митохондрии, лизосомы (или другие микротельца), микросомы (фрагменты гладкой и шероховатой эндоплазматической сети) и, наконец, рибосомы. Осаждение несферических частиц не подчиняется уравнению (2.2), поэтому частицы одинаковой массы, но различной формы осаждаются при разных скоростях. Эта особенность используется при исследовании с помощью ультрацентрифугирования конформации макромолекул (разд. 2.9.3).

Препаративное центрифугирование заключается в выделении биологического материала для последующих биохимических исследований. При этом можно брать большие количества исходного биологического материала, например посевы микробных клеток из периодических или непрерывных культур, а также посевы растительных и животных клеток из культур ткани и плазмы крови. С помощью препаративного центрифугирования выделяют большое ко-

личество клеточных частиц для изучения их морфологии, структуры и биологической активности. Метод применяется также для выделения таких биологических макромолекул, как ДНК и белки из предварительно очищенных препаратов.

Аналитическое центрифугирование применяется главным образом для изучения чистых или практически чистых препаратов макромолекул или частиц, например рибосом. В данном случае используется небольшое количество материала, а седиментация исследуемых частиц непрерывно регистрируется с помощью специальных оптических систем. Метод позволяет получать данные о чистоте, молекулярном весе и структуре материала. В практикумах для студентов препаративное центрифугирование применяется гораздо чаще, чем аналитическое, поэтому мы остановимся на нем более подробно, хотя в основе обоих методов лежат общие принципы.

2.2. Препаративное центрифугирование

2.2.1. Дифференциальное центрифугирование

Этот метод основан на различиях в скоростях седиментации частиц, отличающихся друг от друга размерами и плотностью. Разделяемый материал, например гомогенат ткани, центрифугируют при ступенчатом увеличении центробежного ускорения, которое выбирается так, чтобы на каждом этапе на дно пробирки осаждалась определенная фракция. В конце каждой стадии осадок отделяют от надосадочной жидкости и несколько раз промывают, чтобы в конечном итоге получить чистую осадочную фракцию. К сожалению, получить абсолютно чистый (гомогенный) осадок практически невозможно; чтобы понять, почему это происходит, обратимся к рассмотрению процесса, происходящего в центрифужной пробирке в начале каждой стадии центрифугирования.

Сначала все частицы гомогената распределены по объему центрифужной пробирки равномерно (рис. 2.2, а), поэтому получить чистые препараты осадков самых тяжелых частиц за один цикл центрифугирования невозможно: первый образовавшийся осадок содержит в основном самые тяжелые частицы, но, кроме этого, также некоторое количество всех исходных компонентов. Получить достаточно чистый препарат тяжелых частиц можно лишь при повторном (двух- трехкратном) суспендировании и центрифугировании исходного осадка. Дальнейшее центрифугирование супернатанта при последующем увеличении центробежного ускорения приводит к седиментации частиц средних размеров и плотности, а затем и к осаждению самых мелких частиц, имеющих наименьшую плотность. На рис. 2.3 изображена схема фракционирования гомогената печени крысы.

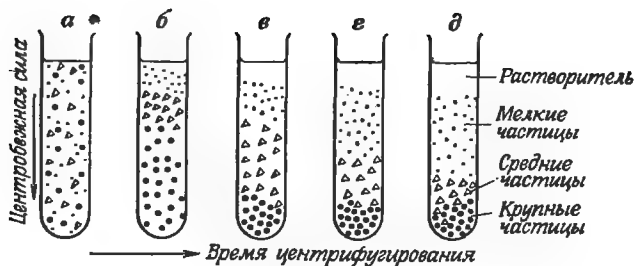


Рис. 2.2. Дифференциальное центрифугирование суспензии частиц в центробежном поле.

Сначала частицы распределены по всему объему центрифужной пробирки равномерно (а); в ходе центрифугирования частицы седиментируют в соответствии с их размерами и формой (б — д).

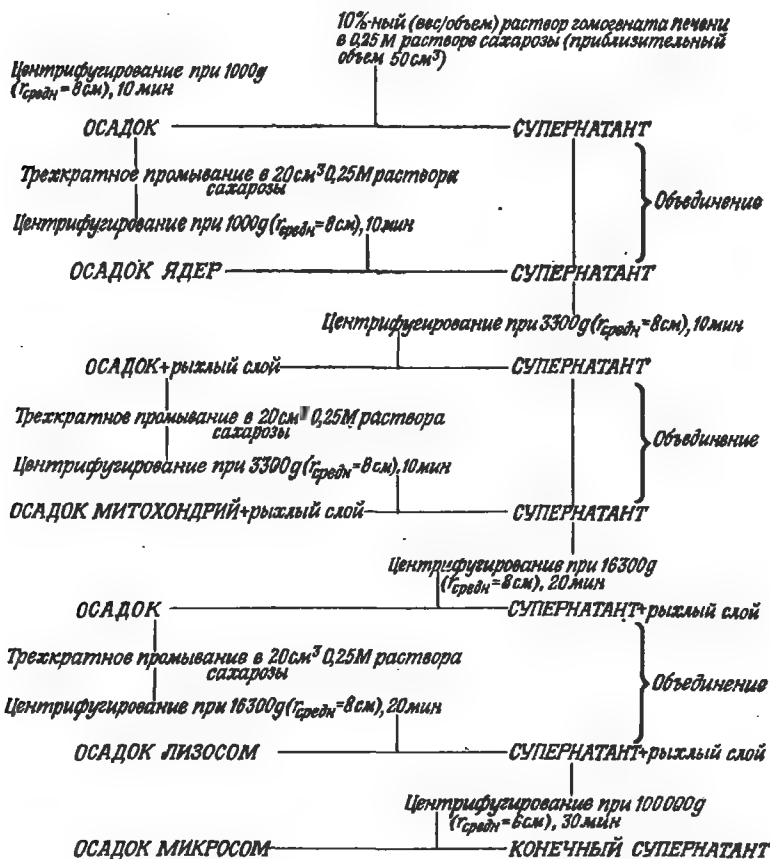


Рис. 2.3. Схема фракционирования гомогената печени крысы на субклеточные фракции.

Дифференциальное центрифугирование является, по-видимому, самым распространенным методом выделения клеточных органелл из гомогенатов тканей. Наиболее успешно применяется этот метод для разделения таких клеточных органелл, которые значительно отличаются друг от друга по размерам и плотности. Но даже и в этом случае получаемые фракции никогда не бывают абсолютно гомогенными, и для их дальнейшего разделения применяют другие методы, описанные ниже (разд. 2.3.1, 2.3.2 и 2.3.3). Эти методы, основанные на различиях в плотности органелл, обеспечивают более эффективное разделение благодаря тому, что центрифугирование осуществляют в растворах с непрерывным или ступенчатым градиентом плотности. Недостатком этих методов является то, что приходится тратить время на получение градиента плотности раствора.

2.2.2. Зонально-скоростное центрифугирование

Метод зонально-скоростного, или, как его еще называют, зонального центрифугирования, заключается в насаивании исследуемого образца на поверхность раствора с непрерывным градиен-

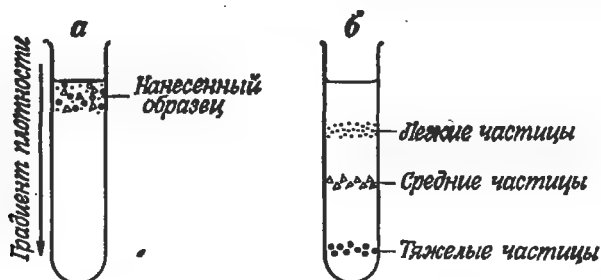


Рис. 2.4. Скоростное и изопикническое разделение частиц в градиенте плотности.

Перед началом центрифугирования суспензию частиц насаивают поверх градиента плотности жидкости (а). При скоростном центрифугировании частицы не достигают изопикнической точки, а при изопикническом разделении центрифугирование продолжают до тех пор, пока исследуемые частицы не достигнут зоны с соответствующей плотностью (б).

том плотности. Затем образец центрифугируют до тех пор, пока частицы не распределятся вдоль градиента в виде дискретных зон или полос (рис. 2.4). Благодаря созданию градиента плотности удается избежать смешивания зон, возникающего в результате конвекции. Метод зонально-скоростного центрифугирования применяется для разделения гибридов РНК—ДНК, субъединиц рибосом и других клеточных компонентов.

2.2.3. Изопикническое центрифугирование

Изопикническое центрифугирование проводят как в градиенте плотности, так и обычным путем. Если центрифугирование проводится не в градиенте плотности, препарат сначала центрифугируют так, чтобы осели частицы, молекулярный вес которых больше, чем у исследуемых частиц. Эти тяжелые частицы отбрасывают, и образец суспендируют в среде, плотность которой такая же, как и у

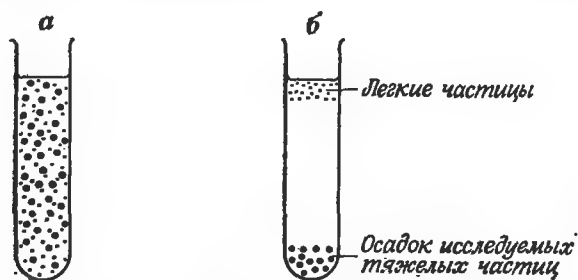


Рис. 2.5. Изопикническое разделение без градиента плотности.

Перед центрифугированием частицы распределены по объему центрифужной пробирки равномерно (а). После центрифугирования более легкие частицы всплывают наверх, в то время как тяжелые оседают на дно пробирки (б).

фракции, которую хотят выделить, а затем центрифугируют до тех пор, пока исследуемые частицы не осадут на дно пробирки, а частицы меньшей плотности не всплывут на поверхность жидкости (рис. 2.5).

Другой способ заключается в наслаивании образца на поверхность раствора с непрерывным градиентом плотности, охватывающим диапазон плотностей всех компонентов смеси. Центрифугирование проводят до тех пор, пока плавучая плотность частиц не сравняется с плотностью соответствующих зон, т. е. пока не произойдет разделение частиц по зонам. Метод получил название зонально-изопикнического, или ρ_v -зонального центрифугирования, так как основным моментом здесь является плавучая плотность (ρ_v), а не размеры или форма частиц (рис. 2.4). На величину плотности, при которой частицы образуют изопикнические полосы, влияет природа среды суспендирования; частицы могут быть проницаемыми для одних соединений, находящихся в растворе, и непроницаемыми для других или же присоединять молекулы раствора. При использовании зонального ротора (разд. 2.5.3) митохондрии, лизосомы, пероксисомы и микросомы концентрируются в полосах с 42%-, 47%-, 47%- и 27%-ной сахарозой, соответствующих плотности 1,18, 1,21, 1,21 и 1,10 г·см⁻³ соответственно. Плотность субклеточных оргanelл зависит также и от избирательного поглощения ими определен-

ных соединений. Введение крысам не вызывающего гемолиз детергента тритона WR-1339 приводит к увеличению размеров и уменьшению плотности лизосом печени; плотность митохондрий и пероксисом остается без изменений. Несмотря на то что седиментационные свойства лизосом при этом, как правило, не меняются, их равновесная плотность в градиенте сахарозы понижается с 1,21 до 1,1, что приводит к соответствующему разделению лизосомально-пероксисомальной фракции. Эта особенность используется при количественном разделении лизосом, митохондрий и пероксисом, основанном на удалении из гомогенной среды всех частиц с большей, чем у микросом, плотностью и последующем изопикническом центрифугировании выпавших в осадок тяжелых частиц.

2.2.4. Равновесное центрифугирование в градиенте плотности

Для создания градиента плотности используют соли тяжелых металлов, например рубидия или цезия, а также растворы сахарозы. Образец, например, ДНК, смешивают с концентрированным раствором хлористого цезия. И растворенное вещество (ДНК), и растворитель сначала распределяются по всему объему равномерно. В ходе центрифугирования устанавливается равновесное распределение концентрации, а следовательно, и плотности CsCl, так как ионы цезия обладают большой массой. Под действием центробежного ускорения молекулы ДНК перераспределяются, собираясь в виде отдельной зоны в части пробирки с соответствующей им плотностью. Метод применяется главным образом в аналитическом центрифугировании и был использован Мезельсоном и Сталем для изучения механизма репликации ДНК *E. coli*. Равновесное центрифугирование в градиенте плотности является также одним из методов разделения и изучения липопротеидов плазмы крови человека.

2.3. Формирование и извлечение градиентов

2.3.1. Природа градиентов

Для создания градиентов плотности растворов чаще всего применяются растворы сахарозы, иногда с фиксированным рН. В некоторых случаях хорошее разделение получается при использовании вместо обычной воды D₂O. В табл. 2.1 приведены свойства некоторых растворов сахарозы.

Выбор градиента диктуется конкретными задачами фракционирования. Так, например, фикол (сополимер сахарозы и эпихлоргидрина, мол. вес 400 000 дальтон), выпускаемый фирмой Pharmacia Fine Chemicals, может заменять сахарозу в тех случаях, когда необходимо создать градиенты с большой плотностью и низким осмо-

Таблица 2.1

Свойства растворов сахарозы

Концентрация, %		Плотность, г·см ⁻³		Вязкость, сП	
весовые	объемные	0°C	20°C	0°C	20°C
2,49	2,5	1,010	1,008	1,90	1,06
4,92	5,0	1,020	1,017	2,04	1,13
12,01	12,6	1,050	1,047	2,64	1,43
23,15	25,4	1,100	1,095	4,45	2,24
43,11	51,5	1,200	1,193	19,8	7,94
60,74	78,6	1,300	1,291	275	66,1
68,88	92,5	1,350	1,340	2440	357

тическим давлением. Еще одно преимущество фикола состоит в том, что он не проходит через клеточные мембраны. Для создания градиентов большей плотности применяют соли тяжелых металлов, например рубидия и цезия, однако из-за коррозирующего действия CsCl такие градиенты используются только в роторах, изготовленных из стойких металлов, например титана.

2.3.2. Методика создания ступенчатого градиента плотности

Для создания градиента плотности в центрифужную пробирку осторожно вносят при помощи пипетки несколько растворов с последовательно уменьшающейся плотностью. Затем на самый верхний слой, имеющий наименьшую плотность, настилают образец в виде узкой зоны, после чего пробирку центрифугируют. Получить плавные линейные градиенты можно за счет сглаживания ступенчатых градиентов при длительном стоянии раствора. Процесс можно ускорить, осторожно перемешивая содержимое пробирки проволокой или слегка покачивая пробирку.

2.3.3. Методика создания плавного градиента плотности

В большинстве случаев для создания плавного градиента плотности пользуются специальным устройством. Оно состоит из двух цилиндрических сосудов строго определенного одинакового диаметра, сообщающихся друг с другом в нижней части с помощью стеклянной трубки с контрольным клапаном, что позволяет регулировать пропорции, в которых смешивается содержимое обоих сосудов. Один из них (смеситель) снабжен мешалкой и имеет выходное отверстие, через которое раствор стекает в центрифужные пробир-

ки. Более плотный раствор помещают в смеситель; второй цилиндр заполняют раствором меньшей плотности. Высота столбика растворов в обоих цилиндрах устанавливается таким образом, чтобы гидростатическое давление в них было одинаковым. Более плотный раствор постепенно выпускается из смесителя в центрифужные пробирки и одновременно замещается равным объемом раствора меньшей плотности, поступающего в смеситель из второго цилиндра через контрольный клапан. Гомогенность раствора в смесителе обеспечивается за счет постоянного перемешивания раствора с помощью мешалки. По мере сливания раствора в центрифужные пробирки плотность его уменьшается и в пробирках создается линейный градиент плотности. Нелинейные градиенты можно создавать при помощи системы, состоящей из двух цилиндров неодинакового диаметра.

Для формирования градиентов плотности различной крутизны пользуются системой из двух механически управляемых шприцов, которые заполняют растворами неодинаковой плотности. Различные градиенты можно создавать, изменяя относительную скорость движения поршней.

2.3.4. Извлечение градиентов из центрифужных пробирок

После завершения центрифугирования и разделения частиц необходимо извлечь образовавшиеся зоны. Это делают несколькими способами, чаще всего методом вытеснения. Центрифужную пробирку прокалывают у основания и в нижнюю ее часть медленно вводят очень плотную среду, например 60—70%-ный раствор сахарозы (весовые %). Находящийся сверху раствор вытесняется, и фракции отбирают при помощи шприца, пипетки или специального приспособления, соединенного через трубочку с коллектором фракций. Если пробирки изготовлены из целлулоида или нитроцеллюлозы, фракции извлекают, надрав пробирку специальным лезвием. Для этого центрифужную пробирку, закрепленную в штативе, надрезают непосредственно под нужной зоной и отсасывают фракцию шприцом или пипеткой. При подходящей конструкции режущего устройства потеря раствора будет минимальной. Сбор фракций осуществляют также, проколов основание пробирки тонкой полый иглой. Капли, вытекающие из пробирки через иглу, собирают в коллектор фракций для дальнейшего анализа.

2.4. Препаративные центрифуги и их применение

Препаративные центрифуги можно подразделить на три основные группы: центрифуги общего назначения, скоростные центрифуги и препаративные ультрацентрифуги.

Центрифуги общего назначения дают максимальную скорость 6000 об·мин⁻¹ и ОЦУ до 6 000 g. Они отличаются друг от друга только емкостью и имеют ряд сменных роторов: угловых и с подвесными стаканами. Одной из особенностей этого вида центрифуг является их большая емкость — от 4 до 6 дм³, что позволяет загружать их не только центрифужными пробирками на 10, 50 и 100 см³, но и сосудами емкостью до 1,25 дм³. Во всех центрифугах этого типа роторы жестко крепятся на валу привода, и центрифужные пробирки вместе с их содержимым должны быть тщательно уравновешены и различаться по весу не более чем на 0,25 г. Нельзя загружать в ротор нечетное число пробирок, а при неполной загрузке ротора пробирки следует размещать симметрично, одна против другой, обеспечивая таким образом равномерное распределение пробирок относительно оси вращения ротора.

Скоростные центрифуги дают предельную скорость 25 000 об·мин⁻¹ и ОЦУ до 89 000 g. Камера ротора снабжена системой охлаждения, предотвращающей нагревание, которое возникает вследствие трения при вращении ротора. Как правило, скоростные центрифуги имеют емкость 1,5 дм³ и снабжены сменными роторами, как угловыми, так и с подвесными стаканами.

Препаративные ультрацентрифуги дают предельную скорость до 75 000 об·мин⁻¹ и максимальное центробежное ускорение 510 000 g. Они снабжены как холодильником, так и вакуумной установкой, чтобы предотвратить перегрев ротора вследствие трения его о воздух. Роторы таких центрифуг изготавливают из высокопрочных алюминиевых или титановых сплавов. В основном применяют роторы из алюминиевых сплавов, однако в тех случаях, когда необходимы особенно высокие скорости, пользуются роторами из титана. Для уменьшения вибрации, возникающей в результате нарушения равновесия ротора из-за неравномерного наполнения центрифужных пробирок, ультрацентрифуги имеют гибкий вал. Центрифужные пробирки и их содержимое должны быть тщательно уравновешены с точностью до 0,1 г. Аналогичные требования следует соблюдать и при загрузке роторов центрифуг общего назначения.

2.5. Конструкция роторов

2.5.1. Угловые роторы и роторы с подвесными стаканами

Роторы препаративных центрифуг обычно бывают двух типов — угловые и с подвесными стаканами. Угловыми они называются потому, что помещаемые в них центрифужные пробирки все время находятся под определенным углом к оси вращения (обычно 20—35°). В роторах с подвесными стаканами пробирки устанавливаются вертикально, а при вращении под действием возникающей центро-

бежной силы переходят в горизонтальное положение; угол наклона к оси вращения составляет 90° .

В угловых роторах расстояние, проходимое частицами до соответствующей стенки пробирки, весьма невелико, и поэтому седиментация происходит сравнительно быстро. После столкновения со стенками пробирки частицы соскальзывают вниз и образуют на дне осадок. При центрифугировании возникают конвекционные потоки, которые в значительной степени затрудняют разделение частиц с близкими седиментационными свойствами. Тем не менее роторы подобной конструкции с успехом применяются для разделения частиц, скорости седиментации которых различаются довольно сильно.

В роторах с подвесными стаканами также наблюдаются конвекционные явления, однако выражены они не так сильно. Конвекция является результатом того, что под действием центробежного ускорения частицы оседают в направлении, не строго перпендикулярном оси вращения, и поэтому, как и в угловых роторах, ударяются о стенки пробирки и соскальзывают на дно.

Конвекционных явлений и эффектов завихрения удастся до некоторой степени избежать, используя пробирки секториальной формы (ячейки Стромайера) в роторах с подвесными стаканами и регулируя (увеличивая и уменьшая) скорость вращения ротора; перечисленных выше недостатков лишен также метод центрифугирования в градиенте плотности.

2.5.2. Роторы непрерывного действия

Роторы непрерывного действия предназначены для скоростного фракционирования относительно небольших количеств твердого материала из суспензий больших объемов, например для выделения клеток из питательных сред. В ходе центрифугирования суспензия частиц добавляется в ротор непрерывно; пропускная способность ротора зависит от природы осаждаемого препарата и варьирует в пределах от 100 см^3 до 1 дм^3 в 1 мин. Особенность ротора состоит в том, что он представляет собой изолированную камеру специальной конструкции; содержимое ее не сообщается с внешней средой, а поэтому не загрязняется и не распыляется.

2.5.3. Зональные роторы, или роторы Андерсона

Зональные роторы делают из алюминиевых или титановых сплавов, которые способны выдерживать весьма значительные центробежные ускорения. Обычно в них имеется цилиндрическая полость, закрываемая съемной крышкой. Внутри полости, на оси вращения расположена осевая трубка, на которую надевается насадка с лопастями, разделяющими полость ротора на четыре сектора. Ло-

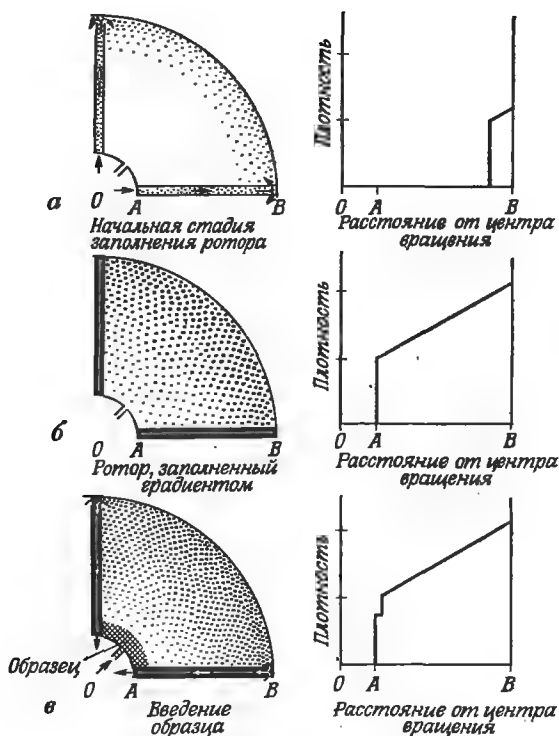
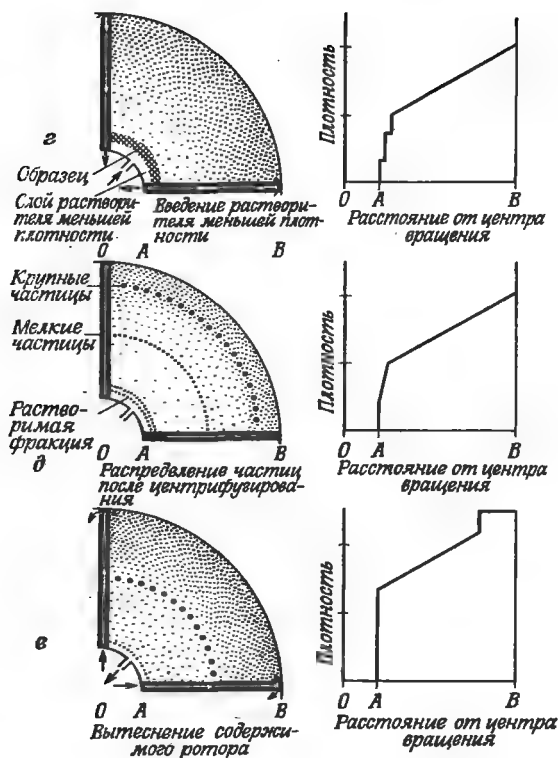


Рис. 2.6. Стадии центрифугирования (а—в) в зональном роторе

пасти или перегородки имеют радиальные каналы, по которым из осевой трубки к периферии ротора нагнетается градиент. Благодаря такой конструкции лопастей конвекция сведена до минимума.

Заполнение ротора производится при его вращении со скоростью около $3000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$. В ротор нагнетают заранее созданный градиент, начиная со слоя наименьшей плотности, который равномерно распределяется по периферии ротора и удерживается у внешней его стенки перпендикулярно оси вращения благодаря центробежной силе (рис. 2.6, а). При последующем добавлении слоев градиента большей плотности происходит непрерывное смещение к центру менее плотных слоев (рис. 2.6, б). После того как в ротор будет нагнетен весь градиент, его заполняют до полного объема раствором, называемым «подушкой», плотность которого совпадает или несколько превышает наибольшую плотность преформированного градиента.



(с любезного разрешения Measuring and Scientific Equipment Ltd.).

Затем через осевую трубку накладывают исследуемый образец (рис. 2.6, а), который вытесняют из трубки в объем ротора с помощью раствора меньшей плотности (рис. 2.6, б), при этом с периферии удаляется такой же объем «подушки». После всех этих процедур скорость вращения ротора доводят до рабочей и в течение необходимого промежутка времени проводят либо зонально-скоростное, либо зонально-изопикническое фракционирование (рис. 2.6, в). Извлечение фракций проводят при скорости вращения ротора 3000 об·мин⁻¹. Содержимое ротора вытесняют путем добавления с периферии «подушки», в первую очередь вытесняются менее плотные слои (рис. 2.6, г). Благодаря особой конструкции осевого канала ротора Андерсона смешивания зон при их вытеснении не происходит. Выходящий градиент пропускают через регистрирующее устройство, например ячейку спектрофотометра, с помощью которого по погло-

щению при 280 нм можно определить содержание белка, или через специальный детектор радиоактивности, после чего собирают фракции.

Емкость зональных роторов, используемых при средних скоростях, варьирует от 650 до 1600 см³, что позволяет получать довольно большое количество материала (до 100 мг). Зональные роторы применяются для удаления белковых примесей из различных препаратов и для выделения и очистки митохондрий, лизосом, полисом и белков.

2.6. Анализ субклеточных фракций

Свойства полученного при фракционировании препарата субклеточных частиц можно отнести к свойствам самих частиц только в том случае, если препарат не содержит примесей. Следовательно, всегда необходимо оценивать чистоту получаемых препаратов. Эффективность гомогенизации и наличие в препарате примесей можно определить с помощью микроскопического исследования. Однако отсутствие видимых примесей еще не является достоверным доказательством чистоты препарата. Для количественной оценки чистоты полученный препарат подвергают химическому анализу, который позволяет установить содержание в нем белков или ДНК, определить его ферментативную активность, если возможно, и иммунологические свойства.

Анализ распределения ферментов во фракционируемых тканях основан на двух общих принципах. Первый из них заключается в том, что все частицы данной субклеточной популяции содержат одинаковый набор ферментов. Второй предполагает, что каждый фермент локализован в каком-то определенном месте внутри клетки. Если бы это положение было верно, то ферменты могли бы выступать в роли маркеров для соответствующих органелл: например, цитохромоксидаза и моноаминоксидаза служили бы ферментами-маркерами митохондрий, кислые гидролазы — маркерами лизосом, каталаза — маркером пероксисом, а глюкозо-6-фосфатаза — маркером мембран микросом. Оказалось, однако, что некоторые ферменты, например малатдегидрогеназа, β -глюкуронидаза, НАДФ·Н-цитохром-с-редуктаза, локализованы более чем в одной фракции. Поэтому к выбору ферментов-маркеров субклеточных фракций в каждом конкретном случае следует подходить с большой осторожностью. Более того, отсутствие фермента-маркера еще не означает отсутствия соответствующих органелл. Вполне вероятно, что при фракционировании происходит потеря фермента органеллами или он ингибируется или инактивируется; поэтому для каждой фракции обычно определяют не менее двух ферментов-маркеров.

Определение ферментативной активности:

Фракция	Объем, см ³	Общее раз- ведение	Экстинк- ция, 660 нм	Единицы активно- сти фермента	Выход активно- сти во фракции, %
Цельный гомогенат	121	1:35	0,45	515	
Ядра	30	1:21,7	0,195	35,2	6,99
Митохондрии	21,5	1:105	0,3	186,3	37
Лизосомы	16,5	1:105	0,34	162	32,17
Микросомы	21	1:27,7	0,41	51,5	10,23
Супернатант	287	1:21,7	0,04	68,5	13,61
				503,5	100

Определение белка:

Фракция	Объем, см ³	Общее разведение	Экстинк- ция, 540 нм	Белок, мг	Выход белка во фракциях, %
Цельный гомогенат	121	1:100	0,175	2100	
Ядра	30	1:80	0,12	320	15,64
Митохондрии	21,5	1:200	0,12	621	30,36
Лизосомы	16,5	1:100	0,076	139	6,81
Микросомы	21	1:100	0,17	397	19,38
Супернатант	287	1:25	0,07	568	27,78
Стандартный белок	—	—	0,09	—	—
				2045	100

Расчет относительной удельной активности:

Выход активности во фракциях, %		Выход белка во фракциях, %	
Ядра:	$\frac{6,99}{15,64} = 0,45$	Митохондрии:	$\frac{37}{30,36} = 1,22$
Лизосомы:	$\frac{32,17}{6,81} = 4,74$	Микросомы:	$\frac{10,23}{19,38} = 0,53$
Супернатант:	$\frac{13,61}{27,78} = 0,49$		

Рис. 2.7. Распределение β -глицерофосфатазы в субклеточных фракциях, выделенных из печени крысы, по данным, полученным с помощью дифференциального центрифугирования.

2.7. Фракционирование методом дифференциального центрифугирования.

Оформление результатов

Результаты, полученные при фракционировании тканей, удобнее всего оформлять в виде графиков. Так, при исследовании распределения ферментов в тканях данные лучше всего представлять в виде гистограмм, дающих возможность визуально оценить результаты проведенных экспериментов.

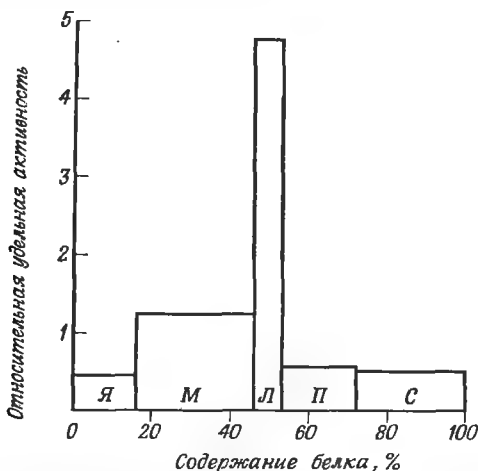


Рис. 2.8. Распределение β -глицерофосфатазы в субклеточных фракциях, выделенных из печени крысы.

Я — фракция ядер; М — фракция митохондрий; Л — фракция лизосом; П — фракция микросом; С — конечный супернатант.

Ферментативную активность и содержание белка в пробе определяют как в исходном гомогенате, так и в каждой выделенной субклеточной фракции в отдельности. Суммарная ферментативная активность и содержание белка во фракциях не должны сильно отличаться от соответствующих значений в исходном гомогенате.

Затем проводят расчет ферментативной активности и содержания белка в каждой фракции в % от общего выхода (рис. 2.7), на основании чего составляют гистограмму (рис. 2.8). По оси абсцисс последовательно откладывают относительное количество белка в каждой фракции в порядке их выделения, а по оси ординат — относительную удельную активность (ОУА) каждой фракции. Таким образом, по площади столбиков определяют ферментативную активность каждой фракции (в %).

2.8. Аналитическое ультрацентрифугирование

В отличие от препаративного центрифугирования, целью которого является разделение веществ и их очистка, аналитическое ультрацентрифугирование применяется в основном для изучения седиментационных свойств биологических макромолекул и других структур. Поэтому в аналитическом центрифугировании применяют роторы и регистрирующие системы особой конструкции: они позволяют непрерывно наблюдать за седиментацией материала в центробежном поле.

Аналитические ультрацентрифуги могут развивать скорость до $70\,000\text{ об}\cdot\text{мин}^{-1}$, создавая при этом центробежное ускорение до $500\,000\text{ g}$. Ротор у них, как правило, имеет форму эллипсоида и соединен посредством струны с мотором, что позволяет варьировать скорость вращения ротора. Вращается ротор в вакуумной камере, снабженной холодильным устройством, и имеет две ячейки, аналитическую и балансировочную, которые устанавливаются в центрифуге строго вертикально, параллельно оси вращения. Балансировочная ячейка служит для уравнивания аналитической и представляет собой металлический блок с прецизионной системой. В ней имеются также два индексных отверстия, находящиеся на строго определенном расстоянии от оси вращения (рис. 2.9), с помощью которых определяют соответствующие расстояния в ана-

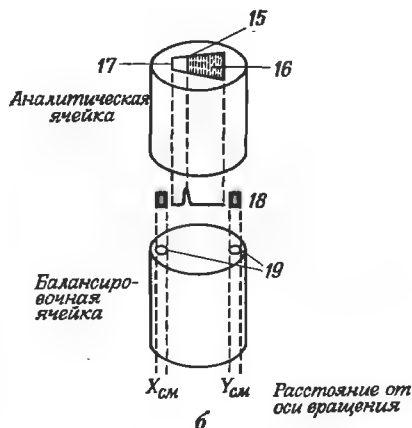
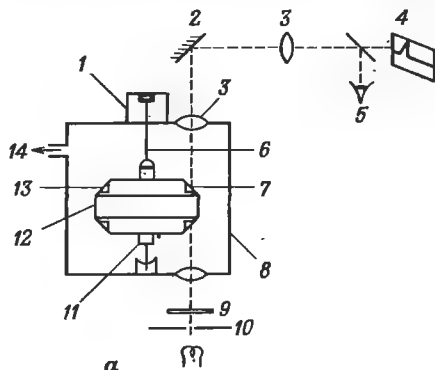


Рис. 2.9. Схематическое изображение системы для аналитического ультрацентрифугирования (а) и аналитической и балансировочной ячеек (б).

1 — мотор; 2 — зеркало; 3 — линза; 4 — фотопластинка; 5 — окуляр; 6 — гибкий вал; 7 — положение аналитической ячейки; 8 — камера ротора; 9 — светофильтр; 10 — источник света; 11 — термистор; 12 — ротор; 13 — положение балансировочной ячейки; 14 — к насосу; 15 — граница; 16 — раствор; 17 — растворитель; 18 — ширен-диаграмма; 19 — индексные отверстия.

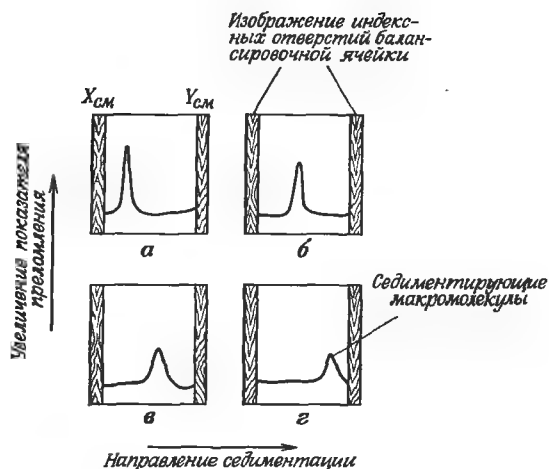


Рис. 2.10. Различные стадии седиментации макромолекул.

Седиментограммы получены с помощью шлирен-системы, позволяющей определять коэффициент преломления раствора в любой точке ячейки в разные промежутки времени. По мере движения макромолекул к дну ячейки в ходе седиментации высота пика уменьшается, а ширина его за счет диффузии образца увеличивается.

литической ячейке. Аналитическая ячейка, емкость которой, как правило, равна 1 см^3 , имеет секториальную форму. При правильной установке в роторе она, несмотря на то что стоит вертикально, работает по тому же принципу, что и ротор с подвесными стаканами, создавая почти идеальные условия седиментации (рис. 2.9). На торцах аналитической ячейки имеются окошки с кварцевыми стеклами. Аналитические ультрацентрифуги снабжены оптическими системами, позволяющими наблюдать за седиментацией частиц в течение всего периода центрифугирования. Через заданные промежутки времени седиментирующий материал можно фотографировать. При фракционировании белков и ДНК за седиментацией наблюдают по поглощению в ультрафиолете, а в тех случаях, когда исследуемые растворы имеют разные коэффициенты преломления — с помощью шлирен-системы или интерференционной системы Рэлея. Два последних метода основаны на том, что при прохождении света через прозрачный раствор, состоящий из зон с различной плотностью, на границе зон происходит преломление света. При седиментации между зонами с тяжелыми и легкими частицами образуется граница, которая действует как преломляющая линза; при этом на фотопластинке, используемой в качестве детектора, появляется пик. В ходе седиментации происходит перемещение границы, а следовательно, и пика, по скорости передвижения которого можно судить о скорости седиментации материала (рис. 2.10). Интерферометричес-

кие системы отличаются большей чувствительностью, чем шпирен-системы. Аналитические ячейки бывают односекторные, которые применяются наиболее часто, и двухсекторные, которые используются для сравнительного изучения растворителя и растворенного вещества.

В биологии аналитическое ультрацентрифугирование применяется для определения молекулярных весов макромолекул, проверки чистоты получаемых образцов, а также для исследования конформационных изменений в макромолекулах. Все эти вопросы кратко освещены в следующем разделе.

2.9. Применение аналитического ультрацентрифугирования

2.9.1. Определение молекулярных весов

Существует три основных метода определения молекулярных весов при помощи аналитического ультрацентрифугирования: определение скорости седиментации, метод седиментационного равновесия и метод приближения к седиментационному равновесию.

Определение молекулярного веса по скорости седиментации — это наиболее распространенный метод. Центрифугирование проводят при больших скоростях, так что частицы, вначале равномерно распределенные по всему объему, начинают упорядоченно перемещаться по радиусу от центра вращения. Между областью растворителя, уже свободной от частиц, и той его частью, которая их содержит, образуется четкая граница раздела. Эта граница при центрифугировании перемещается, что дает возможность определять скорость седиментации частиц при помощи одного из вышеупомянутых методов, регистрируя это перемещение на фотопластинке.

Скорость седиментации определяется следующим соотношением:

$$s = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{\omega^2 x},$$

где x — расстояние от оси вращения в см, t — время в с, ω — угловая скорость в $\text{рад} \cdot \text{с}^{-1}$, s — коэффициент седиментации молекулы.

Коэффициент седиментации — это скорость, отнесенная к единице ускорения, его измеряют в *единицах Сведберга (S)*; 1 единица Сведберга равна 10^{-13} с. Численное значение s зависит от молекулярного веса и формы частиц и является величиной, характерной для данной молекулы или надмолекулярной структуры. Например, коэффициент седиментации лизоцима равен 2,15 S; каталаза имеет коэффициент седиментации 11,35S, субъединицы рибосом бактерий — от 30 до 50S, а субъединицы рибосом эукариотов — от 40 до 60S.

Молекулярный вес молекул определяют по уравнению Сведберга

$$M = \frac{RTs}{D(1 - \bar{v}_p)},$$

где M — молекулярный вес молекулы, R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, s — коэффициент седиментации молекулы, D — коэффициент диффузии молекулы, $\bar{v}$ — парциальный удельный объем, который можно рассматривать как объем, занимаемый одним граммом растворенного вещества, ρ — плотность растворителя.

Метод седиментационного равновесия. Определение молекулярных весов этим методом проводится при сравнительно небольших скоростях вращения ротора, порядка 7 000—8 000 об·мин⁻¹, чтобы молекулы с большим молекулярным весом не осаждались на дно. Ультрацентрифугирование проводят вплоть до достижения частицами равновесия, устанавливающегося под действием центробежных сил, с одной стороны, и диффузионных — с другой, т. е. до тех пор, пока частицы не перестанут перемещаться. Затем по образовавшемуся градиенту концентрации рассчитывают молекулярный вес вещества согласно формуле

$$M = \frac{2RT \ln (c_2/c_1)}{\omega^2 (1 - \bar{v}_p) (r_2^2 - r_1^2)},$$

где R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, ω — угловая скорость, ρ — плотность растворителя, $\bar{v}$ — парциальный удельный объем, c_1 и c_2 — концентрация растворенного вещества на расстояниях r_1 и r_2 от оси вращения.

Недостатком данного метода является то, что для достижения седиментационного равновесия необходимо длительное время — от нескольких дней до нескольких недель при непрерывной работе центрифуги.

Метод приближения к седиментационному равновесию был разработан для того, чтобы избавиться от недостатков предыдущего метода, связанных с большими затратами времени, необходимого для установления равновесия. С помощью этого метода можно определять молекулярные веса, когда центрифугируемый раствор находится в состоянии приближения к равновесию. Вначале макромолекулы распределяются по всему объему аналитической ячейки равномерно; затем по мере центрифугирования молекулы оседают, и плотность раствора в области мениска постепенно уменьшается. Изменение плотности тщательно регистрируют, а затем путем сложных расчетов, включающих большое число переменных, определяют молекулярный вес данного соединения по формулам:

$$M_m = \frac{RT}{(1 - \bar{v}_p)} \frac{(dc/dr)_m}{\omega^2 c_m r_m},$$

$$M_d = \frac{RT}{(1 - \bar{v}_p)} \frac{1}{\omega^2 c_d r_d} \left(\frac{dc}{dr} \right)_d,$$

где R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, $\bar{v}$ — парциальный удельный объем, ρ — плотность растворителя, dc/dr — градиент концентрации макромолекулы, r_m и r_d — расстояние до мениска и дна пробирки соответственно, c_m и c_d — концентрация макромолекул у мениска и у дна пробирки соответственно, M_m и M_d — величины молекулярных весов, определенные по распределению концентрации вещества у мениска и дна пробирки соответственно.

2.9.2. Оценка чистоты препаратов

Аналитическое ультрацентрифугирование широко применяется для оценки чистоты препаратов ДНК, вирусов и белков. Чистота препаратов несомненно очень важна в тех случаях, когда требуется точно определить молекулярный вес молекулы. В большинстве случаев о гомогенности препарата можно судить по характеру границы седиментации, используя метод определения скорости седиментации: гомогенный препарат обычно дает одну резко очерченную границу. Присутствующие в препарате примеси проявляются в виде дополнительного пика или плеча; они же обуславливают асимметрию основного пика.

2.9.3. Исследование конформационных изменений в макромолекулах

Еще одна область применения аналитического ультрацентрифугирования — исследование конформационных изменений макромолекул. Молекула ДНК, например, может быть одно- или двухцепочечной, линейной или кольцевой. Под действием различных соединений (таких, например, как органические растворители) или при повышенных температурах ДНК претерпевает ряд обратимых и необратимых конформационных изменений, которые можно установить по изменению скорости седиментации образца. Чем более компактна молекула, тем меньше ее коэффициент трения в растворе и наоборот: чем менее она компактна, тем больше коэффициент трения и, следовательно, тем медленнее будет она седиментировать. Таким образом, различия в скорости седиментации образца до и после различных воздействий на него позволяют обнаруживать конформационные изменения, происходящие в макромолекулах.

У аллостерических белков, таких, например, как аспарат-транскарбамоилаза, конформационные изменения возникают в результате связывания их с субстратом и (или) малыми лигандами (активаторами или ингибиторами). Диссоциацию белка на субъеди-

ницы (протомеры) можно вызывать, обработав его такими веществами, как мочеви́на или парахлормеркурибензоат. Все эти изменения легко можно проследить при помощи аналитического ультрацентрифугирования.

2.10. Рекомендуемая литература

- Allfrey V.*, Isolation of subcellular components. In the Cell. Vol. I. Ed. by Brachet, J. and Mirsky, A. E. Academic Press, London, 1959. (Обзор существующих методов разделения субклеточных компонентов.)
- Bowen T. J.*, An Introduction to Ultracentrifugation. Wiley-Interscience, John Wiley, London, 1970. (Введение в ультрацентрифугирование.)
- DeDuve C.*, General principles. In Enzyme Cytology. Ed. by Roodyn, D. B. Academic Press, London, 1967. (В статье содержится описание общих принципов разделения и последующего анализа субклеточных структур.)
- National Cancer Institute Monograph 21, The Development of Zonal Centrifuges and Ancillary Systems for Tissue Fractionation and Analysis. National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, U.S.A., 1966. (Монография представляет собой фундаментальное исследование, освещающее историю создания зонального ротора и область применения зонального центрифугирования; описаны материалы, применяющиеся для создания градиентов.)

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

3.1. Общие принципы хроматографии

Задача, с которой биохимикам постоянно приходится сталкиваться при исследовании биологических соединений,— это их выделение и очистка. Одним из наиболее удобных методов разделения является хроматографический метод, с помощью которого можно разделять как большие (несколько граммов), так и малые (пикограммы) количества материала. Выбор того или иного вида хроматографии зависит от природы выделяемого материала; зачастую для достижения необходимой степени очистки приходится последовательно применять несколько хроматографических методов. Со времени изобретения хроматографии как аналитического метода исследования появилось множество его модификаций, что значительно расширило область его применения. В последующих разделах дается краткое описание основных видов хроматографии, широко применяющихся в биохимической практике.

Распределение соединения между двумя несмешивающимися фазами определяется *коэффициентом распределения*. Для конкретного вещества коэффициент распределения его в системе, состоящей из двух растворителей (I и II), является при данной температуре постоянной величиной и выражается следующим отношением:

$$\frac{\text{Концентрация вещества в растворителе I}}{\text{Концентрация вещества в растворителе II}} = \text{const.}$$

Понятие «распределение вещества» относится к распределению его не только между двумя растворителями, но и между любыми двумя фазами, например твердой и жидкой или газовой и жидкой фазами. Если коэффициент распределения вещества в какой-либо системе, например, кремниевая кислота—бензол, равен 0,5, это значит, что концентрация его в бензоле вдвое выше, чем в кремниевой кислоте. Понятие «коэффициент распределения вещества» является основополагающим в хроматографии. Для удобства под коэффициентом распределения в данном случае понимают отношение концентрации вещества в подвижной фазе к его концентрации в неподвижной фазе.

Термином *эффективный коэффициент распределения* обозначают отношение общего количества вещества (в отличие от концентрации) в одной фазе к общему количеству этого вещества в другой фазе;

другими словами, это есть произведение коэффициента распределения вещества и отношения объемов обеих фаз. Пусть коэффициент распределения данного вещества между двумя растворителями I и II равен единице; тогда, если вещество уравнивается между 10 см³ первого растворителя и 1 см³ второго, его концентрация в обеих фазах будет одинаковой, однако общее количество вещества в растворителе I будет в 10 раз превышать его количество в растворителе II.

Все хроматографические системы состоят, как правило, из двух фаз. Одной из них является *неподвижная фаза*, которая бывает твердой, жидкой или представляет собой смесь твердой и жидкой фаз. Вторая, *подвижная фаза*, может быть жидкой или газообразной; она обычно течет по неподвижной фазе или пропускается через нее. Фазы для хроматографического разделения выбирают так, чтобы коэффициенты распределения компонентов смеси в них были различными. Разделение может происходить за счет установления:

а) адсорбционного равновесия между неподвижной твердой и подвижной жидкой фазами (*адсорбционная хроматография*);

б) равновесного распределения между неподвижной жидкой (или полужидкой) и подвижной жидкой фазами (*противоточное распределение и хроматография на бумаге*);

в) равновесного распределения между неподвижной жидкой и подвижной газовой фазами (*газожидкостная хроматография*);

г) ионообменного равновесия между ионообменной смолой (неподвижная фаза) и электролитом (подвижная фаза) (*ионообменная хроматография*).

д) равновесия между жидкой фазой на внутренней и внешней поверхностях пористой структуры или «молекулярного сита» (*проницающая хроматография*);

е) равновесного связывания макромолекулы с малой молекулой, по отношению к которой она проявляет высокую биологическую специфичность, а следовательно, и сродство (*аффинная хроматография*).

Принцип, на котором основано разделение, легко понять на примере работы стеклянной хроматографической колонки. Пусть колонка заполнена на высоту 5 см твердой гранулированной неподвижной фазой, окруженной подвижной жидкой фазой (1 см³ на 1 см высоты колонки) (рис. 3.1). Если внести в верхнюю часть колонки 1 см³ растворителя, содержащего, например, 32 мкг анализируемого вещества, то этот объем по мере продвижения его по колонке займет положение А, а равный объем растворителя (1 см³) выйдет из колонки. Если эффективный коэффициент распределения вещества равен единице, то оно распределится между твердой и жидкой фазами равномерно. При добавлении нового объема (1 см³) растворителя объем, находившийся в положении А, перейдет в положение Б, увлекая за собой 16 мкг анализируемого вещества;

Рис. 3.1. Схема разделения веществ с помощью хроматографии на колонке.

С

остальные 16 мкг останутся в положении А. В обоих положениях, А и Б, вещество перераспределится таким образом, что 8 мкг его перейдут в растворитель, а остальные 8 мкг будут находиться в твердой фазе. Добавление

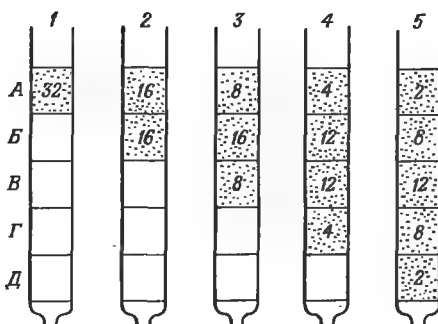
еще одной порции растворителя (1 см^3) вызовет перемещение объема, находившегося в положении А, в положение Б, из которого раствор переместится соответственно в положение В, в результате чего вещество распределится так, как это показано на стадии 3. Распределение вещества после последовательного добавления двух новых порций растворителя (каждая по 1 см^3) показано в положениях 4 и 5.

Очевидно, что после пяти добавлений растворителя (уравновешиваний) исследуемое вещество распределится по всему объему колонки, причем его концентрация будет максимальна в середине колонки. Если эффективный коэффициент распределения вещества меньше единицы, то после каждого уравновешивания в твердой фазе будет оставаться более 50% вещества. Пик концентрации будет расположен несколько выше середины колонки, хотя некоторая часть исследуемого вещества распределится по всему объему. И наоборот, если эффективный коэффициент распределения вещества больше единицы, пик концентрации будет находиться ниже середины колонки.

Чем больше число уравновешиваний, тем выше концентрация вещества в определенной части колонки; таким образом, характер распределения смеси веществ зависит в основном от двух факторов: коэффициента распределения и числа уравновешиваний. Скорость прохождения соединения через колонку определяется величиной эффективного коэффициента распределения данного соединения, а форма образующегося пика зависит от числа проведенных уравновешиваний.

Поскольку растворитель добавляется в колонку непрерывно, в действительности процесс установления равновесия происходит постоянно. Число уравновешиваний, как правило, исчисляется тысячами и определяется так называемым *числом теоретических*

Стадии



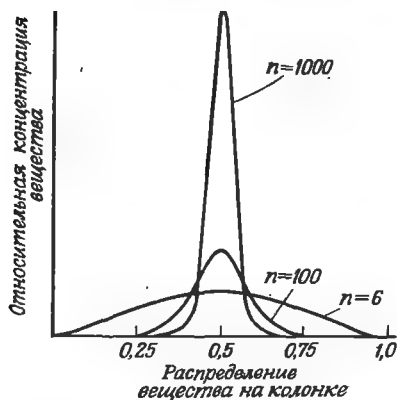


Рис. 3.2. Зависимость профиля элюции от числа теоретических тарелок n .

тарелок. Этим термином обычно пользуются для обозначения эффективности дистилляционных колонок; в хроматографии оно выражает число уравниваний. Чем выше эффективность колонки, тем больше число теоретических тарелок. На рис. 3.2

изображена зависимость профиля элюции вещества с эффективным коэффициентом распределения, равным 1, от числа теоретических тарелок n .

3.2. Адсорбционная хроматография

3.2.1. Принцип метода

Адсорбционная хроматография впервые была использована Цветом для разделения окрашенных веществ. В общепринятом смысле *адсорбент* — это твердое вещество, способное удерживать на своей поверхности молекулы; эта способность особенно ярко выражена в тех случаях, если поверхность адсорбента содержит большое количество мелких пор. В отличие от ионообменных смол (см. разд. 3.6.1), притяжение молекул к поверхности адсорбента в идеальных условиях не является электростатическим. Сорбция веществ может быть специфической, что позволяет избирательно адсорбировать одно вещество из смеси. В основе разделения методом адсорбционной хроматографии лежат различия в степени адсорбции данных веществ адсорбентом и растворимости их в соответствующем растворителе. Эти свойства определяются в основном молекулярной структурой соединения.

3.2.2. Хроматография на колонке

Колонка для адсорбционной хроматографии представляет собой стеклянную трубку, заполненную адсорбентом. На колонку наносят подлежащую разделению смесь веществ, а затем пропускают через нее растворитель (или смесь растворителей). Разделение основано на том, что вещества с более высоким эффективным коэффициентом распределения продвигаются по колонке с большей скоростью, отделяясь таким образом от веществ с более низким коэффициентом. Если исследуемые соединения окрашены, то при разделении можно

видеть движение по колонке окрашенных полос. Образующиеся в результате разделения зоны извлекают одним из двух способов. Колонку высушивают, окрашенные полосы вырезают, а затем элюируют из зон разделенный материал. Другой способ заключается в том, что растворитель пропускают через колонку до тех пор, пока не соберут все фракции по мере их выхода. Этот метод более пригоден, поскольку при соприкосновении с воздухом, как это имеет место в первом случае, адсорбированный материал может разлагаться.

Как правило, разделяемые с помощью хроматографии на колонке вещества не окрашены; в этом случае весь выходящий из колонки материал собирают в виде фракций, а затем анализируют их. В большинстве случаев вымывание осуществляется за счет увеличения полярности растворителя (*градиентная элюция*, разд. 3.10.5). Некоторые компоненты образца элюируют в исходном растворителе; для удаления более прочно связанных веществ применяют более полярные растворители. Если разделяемые соединения в растворе большей полярности растворяются лучше, эффективный коэффициент

Таблица 3.1

Некоторые растворители в порядке возрастания их полярности

Растворитель	Диэлектрическая постоянная при 25°C
Гексан	1,89
Гептан	1,92
Циклогексан	2,02
1,4-диоксан	2,21
Тетрахлорметан	2,24
Бензол	2,28
Толуол	2,38
Ацетонитрил	3,88
Диэтиловый эфир	4,34
Хлороформ	4,87
Муравьиная кислота	5,0
Изоамиловый спирт	5,82
Этилацетат	6,02
Ледяная уксусная кислота	6,15
Тетрагидрофуран	7,58
Дихлорметан	9,14
<i>трет</i> -Бутанол	10,9
Пиридин	12,3
Бутанол	15,8
Изобутанол	17,7
<i>n</i> -Бутанол	17,8
2-пропанол	18,3
1-пропанол	20,1
Ацетон	20,7
Этанол	24,3
Метанол	33,6

ент распределения повышается (разд. 3.1). В табл. 3.1 приведен перечень растворителей в порядке увеличения их полярности (диэлектрической постоянной).

Эффективность разделения чрезвычайно сильно зависит от правильного заполнения колонки адсорбентом (разд. 3.10.2). Обычно применяемые адсорбенты — кремниевая кислота, окись алюминия, карбонат кальция, карбонат цинка и окись магния; выбор адсорбента и системы растворителей для элюции диктуется задачами конкретного анализа. При выборе адсорбентов следует иметь в виду, что некоторые из них в процессе разделения оказывают разрушающее действие на определенные соединения. Другие адсорбенты при хранении поглощают из атмосферы воду, что отрицательно сказывается на их адсорбционных свойствах. В таких случаях, для того чтобы удалить воду и активировать адсорбент, его прогревают в течение некоторого времени при температуре 110°C. Зачастую из-за присутствия в адсорбенте воды разделение, напротив, становится более эффективным, что объясняется участием в процессе как сорбции, так и распределения вещества между разными фазами.

3.2.3. Тонкослойная хроматография (ТСХ)

Этот метод особенно успешно применяется для разделения очень малых количеств материала. В своей основе он сходен с колоночной хроматографией; иными словами, тонкослойная хроматография — это по своей сути адсорбционная хроматография, хотя в первом случае могут играть роль и процессы распределения. При ТСХ слой адсорбента наносят на стеклянные пластинки. В отличие от колоночной хроматографии применяемые в ТСХ адсорбенты содержат связывающие агенты, например сернокислый кальций, что способствует лучшей фиксации их на стеклянной пластинке. Адсорбент наносят на пластинки в виде кашицеобразной суспензии; нанесение начинают с одного конца, постепенно переходя к другому; затем пластинки высушивают в сушильном шкафу при температуре 100—120°C. После испарения воды на пластинках остается тонкий слой адсорбента. Для одновременного покрытия ровным слоем суспензии адсорбента большого количества пластинок пользуются специальными аппликаторами. При проведении качественного анализа суспензию наносят слоем толщиной в 0,25 мм; в препаративной ТСХ толщина слоя достигает 5 мм. В табл. 3.2 приводится перечень адсорбентов, которые обычно применяются при ТСХ.

Пробу в виде пятна наносят на пластинку при помощи микропипетки или шприца на расстоянии приблизительно 2,5 см от нижнего края пластинки и примерно на таком же расстоянии от одной из боковых сторон. Затем пробу подсушивают (чаще всего с помощью вентилятора) для удаления растворителя, чтобы на это же место можно было повторно наносить новые порции. Все пятна следует

Таблица 3.2

Адсорбенты, применяющиеся в тонкослойной хроматографии

Адсорбент	Исследуемые соединения
Силикагель	Аминокислоты, алкалоиды, сахара, жирные кислоты, липиды, эфирные масла, неорганические анионы и катионы, стероиды, терпеноиды
Оксид алюминия	Алкалоиды, пищевые красители, фенолы, стероиды, витамины, каротины, аминокислоты
Кизельгур	Сахара, олигосахариды, двухосновные кислоты, жирные кислоты, триглицериды, аминокислоты, стероиды
Целит	Стероиды
Целлюлозный порошок	Аминокислоты, пищевые красители, алкалоиды, нуклеотиды
Ионообменная целлюлоза	Нуклеотиды
Крахмал	Аминокислоты
Сефадекс	Аминокислоты, белки

наносить на одном и том же расстоянии от кромки пластинки и тщательно следить за тем, чтобы слой адсорбента в месте нанесения пробы не нарушался.

Разделение проводят в стеклянной камере. На дно ее наливают растворитель слоем толщиной 1,5 см, затем закрывают стеклянной крышкой и оставляют на 1 ч для насыщения камеры парами растворителя (*уравновешивание*). Если этого не сделать, то растворитель, поднимаясь вверх по пластинке, будет испаряться, что отразится на качестве разделения. После достижения равновесия снимают крышку и помещают в камеру хроматографическую пластинку. Ее устанавливают вертикально так, чтобы место нанесения пробы было несколько выше уровня растворителя. Затем камеру снова накрывают крышкой; растворитель поднимается вверх по пластинке и таким образом происходит разделение. Температура в камере в ходе всего процесса разделения должна быть постоянной.

Эффективность разделения можно повысить с помощью *двухмерной хроматографии*. В этом случае пробу наносят в виде отдельного пятна в нижний угол пластинки и проводят разделение в одном направлении. Затем пластинку вынимают из камеры и высушивают, после чего хроматографируют в другой системе растворителей в направлении, перпендикулярном первому (рис. 3.3).

Многие фирменные адсорбенты для ТСХ содержат флуоресцирующие красители; после разделения пластинки просматривают в ультрафиолетовом свете, и отдельные компоненты выявляются на них в виде синих, зеленых или темных пятен. Эти пятна отмечают, соскабливают, а затем элюируют соответствующее соединение при помощи растворителя, вымывающего это соединение, но не раство-

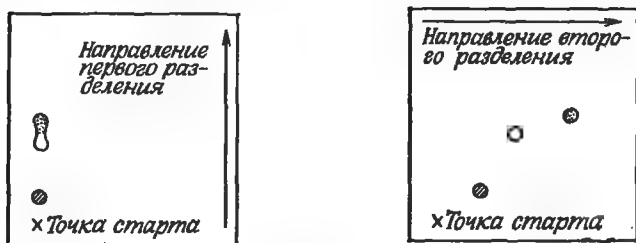


Рис. 3.3. Двухмерная хроматограмма.

ряющего краситель. Это особенно важно в тех случаях, когда разделяемые компоненты нужно исследовать дальше и определять их количество.

Если адсорбенты не содержат красителей, то положение соединений на пластинке определяют другими методами. При опрыскивании пластинок 50%-ным раствором серной кислоты и последующем их нагревании большинство соединений обугливается, в результате чего на пластинках в соответствующих местах проявляются коричневые пятна. Флуоресцирующие или поглощающие ультрафиолетовый свет соединения можно обнаружить, просматривая пластинки в УФ-свете. Ненасыщенные соединения хорошо окрашиваются в присутствии паров иода. Опрыскивание пластинок особыми красящими агентами вызывает окрашивание определенных соединений: так, например, нингидрин применяется для идентификации аминокислот. Действие большинства таких красителей основано на специфических количественных цветных реакциях (разд. 5.3.2). При разделении радиоактивных веществ можно получать автордиограммы пластинок; местоположения компонентов определяют по темным пятнам на рентгеновской пленке. Иногда пластинки просчитывают на счетчиках при помощи специальных сканирующих устройств.

Как мы уже говорили, после проведения ТСХ разделенные соединения удаляют с пластинок, соскабливая их вместе с адсорбентом и элюируя с помощью соответствующих растворителей.

Покрывая пластинки более толстым слоем адсорбента (до 5 мм), можно одновременно хроматографировать гораздо большее количество материала (*препаративная ТСХ*). В этом случае пробу наносят не в виде пятна, а в виде полосы вдоль одной из сторон пластинки; после хроматографирования соединения располагаются на пластинке в виде отдельных полос.

Далеко не всегда можно идентифицировать соединения по значению величины R_F (определение см. в разд. 3.3.1), так как эта величина не является постоянной. Поэтому по возможности пробу

следует хроматографировать вместе с известными соединениями (стандартами).

Часто разделить сложные смеси веществ при помощи обычных адсорбентов не удастся. Для разделения некоторых смесей с успехом применяют метод *аргентации в тонком слое* (серебрение). В этом случае при подготовке пластинок к суспензии адсорбента добавляют азотнокислое серебро; по мере высыхания пластинок адсорбент пропитывается AgNO_3 . Этот метод особенно хорош для разделения веществ, отличающихся друг от друга количеством и расположением связей, поэтому он применяется в основном для разделения липидов.

В данном разделе ТСХ рассматривается как метод разделения, основанный на сорбции веществ, однако имеются адсорбенты (например, целлюлозный порошок), которые одновременно обладают как адсорбционными свойствами, так и распределяющей способностью. Путем специальной обработки адсорбента можно почти полностью превратить процесс в распределительное разделение (разд. 3.3.1). При подготовке пластинок адсорбенты для повышения эффективности разделения часто насыщают различными буферами. В табл. 3.3. приведены некоторые системы растворителей, применяющихся для разделения определенных групп соединений.

Одно из главных преимуществ метода ТСХ — быстрота разделения. Применение в качестве подвижной фазы летучих веществ позволяет сократить время разделения до 30 мин, однако даже

Таблица 3.3

Некоторые системы растворителей,
применяющиеся в тонкослойной хроматографии

Соединения	Адсорбент	Система растворителей, объем/объем
Аминокислоты	Силикагель G	96%-ный этанол/вода (70/30) н-Бутанол/уксусная кислота/вода (80/20/20)
Моно- и дисахариды	Кизельгур G (ацетат натрия) Кизельгур G (фосфат натрия, pH 5)	Этилацетат/1-пропанол (65/35) н-Бутанол/ацетон/фосфатный буфер, pH 5 (40/50/10)
Нейтральные липиды	Силикагель G	Петролейный эфир/диэтиловый эфир/ацетон (90/10/1)
Холестериновые эфиры	Силикагель G	Тетрахлорэтан/хлороформ (95/5)
Каротиноиды	Кизельгур G	Петролейный эфир/1-пропанол (99/1)
Фосфолипиды	Силикагель G	Хлороформ/метанол/вода (65/25/4)

при применении нелетучих растворителей продолжительность разделения редко превышает 90 мин.

Существуют некоторые виды хроматографической бумаги, заранее пропитанной адсорбентом. Они применяются в бумажной хроматографии (разд. 3.3.1), но действие их основано на сорбции.

3.3. Распределительная хроматография

3.3.1. Хроматография на бумаге

Этот метод основан на распределении соединения между двумя жидкими фазами. Хроматографическая бумага обладает свойством поглощать воду из атмосферы и задерживать ее между своими целлюлозными волокнами. Эту воду можно рассматривать как один из растворителей; она представляет собой неподвижную фазу. Когда по бумаге под действием капиллярных сил движется неводный растворитель (подвижная фаза), молекулы вещества, нанесенного на бумагу, распределяются между двумя фазами в соответствии с их коэффициентом распределения. Чем выше растворимость вещества в подвижной фазе, тем дальше оно продвинется по бумаге вместе с растворителем, и наоборот.

Зачастую подвижная фаза представляет собой смешивающийся с водой растворитель (например, ацетон и бутанол); казалось бы, в таких случаях разделения не должно происходить, поскольку имеется только одна фаза (обычно для разделения требуется два несмешивающихся растворителя). Однако если вдуматься, что такое хроматографическая бумага, станет ясно, что более правильно рассматривать ее как комплекс целлюлоза—вода. По мнению ряда авторов, этот комплекс напоминает концентрированные водные растворы полисахаридов. Такие растворы никогда не смешиваются с большинством органических растворителей, в том числе и с теми, которые смешиваются с водой.

Расстояние, пройденное нанесенным на бумагу соединением в направлении движения растворителя, характеризуется *величиной* R_F и определяется следующим отношением:

$$\frac{\text{Расстояние, пройденное растворенным соединением}}{\text{Расстояние, пройденное фронтом растворителя}}$$

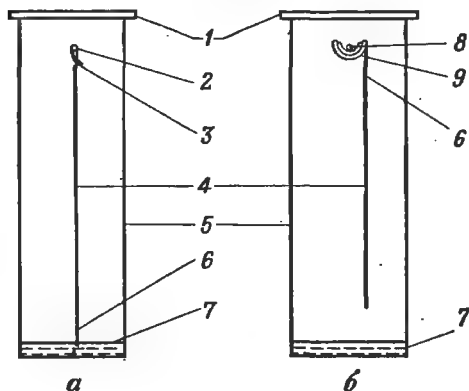
В стандартных экспериментальных условиях эта величина является для данного соединения постоянной и соответствует его коэффициенту распределения. Для углеводов вместо величины R_F для удобства пользуются *величиной* R_G , которая выражается так:

$$\frac{\text{Расстояние, пройденное углеводом}}{\text{Расстояние, пройденное глюкозой}}$$

т. е. все величины определяются по отношению к глюкозе.

Рис. 3.4. Восходящая (а) и нисходящая (б) хроматография на бумаге.

1 — крышка; 2 — держатель; 3 — зажим; 4 — бумага; 5 — стеклянная камера; 6 — место нанесения пробы; 7 — растворитель; 8 — стеклянная палочка; 9 — лоток с растворителем.



Хроматография и рование на бумаге проводят *восходящим* и *нисходящим* способами (рис. 3.4). И в том, и в другом случае растворитель

наливают на дно герметичной камеры или стеклянного резервуара для насыщения атмосферы парами растворителя, и лишь затем помещают в камеру бумагу. При восходящей хроматографии бумажную полосу либо погружают в растворитель вертикально, например, свернув ее трубкой, либо подвешивают таким образом, чтобы нижний конец полосы бумаги был погружен в растворитель. Место нанесения пробы должны находиться на определенном расстоянии от поверхности растворителя; по мере движения растворителя под действием капиллярных сил вертикально вверх происходит разделение веществ. При нисходящей хроматографии верхний конец бумажной полосы с образцом, нанесенным недалеко от кромки бумаги, закрепляют в лотке, находящемся в верхней части камеры, а нижний конец бумаги спускают вниз так, чтобы он не соприкасался с налитым на дно камеры растворителем. Перед началом хроматофирования лоток заполняют растворителем. Под действием капиллярных сил и силы тяжести растворитель начинает двигаться вниз по бумажной полосе, в ходе чего и происходит разделение. Из-за простоты первый вид хроматографии применяется чаще, однако скорость движения растворителя при нисходящей хроматографии гораздо выше, чем при восходящей.

Хроматографию на бумаге, так же как и ТСХ, можно проводить двухмерным способом (разд. 3.2.3). Существуют различные типы бумаги, различающиеся по своим характеристикам — так называемые медленная, средняя, быстрая. Для удаления загрязнений, затрудняющих в ряде случаев дальнейший анализ, некоторые виды хроматографической бумаги обрабатывают кислотой. Марки бумаги различаются также и по степени поглощения сухими волокнами воды, содержание которой колеблется от 115 до 195%. Одномерные хроматограммы всегда следует разгонять по ходу волокон, в соответствии с рекомендациями, указанными на упаковке. В табл. 3.4 приведены некоторые системы растворителей, обычно использую-

щиеся для разделения ряда биологических соединений методом обычной распределительной хроматографии на бумаге.

**Некоторые системы растворителей,
применяющихся в хроматографии на бумаге**

Таблица 3.4

Соединения	Система растворителей, объем/объем
Аминокислоты	<i>n</i> -Бутанол/уксусная кислота/вода (40/10/50) <i>n</i> -Бутанол/пиридин/вода (33/33/33) Метанол/пиридин/вода (25/12/63)
Моно- и дисахариды	<i>n</i> -Бутанол/пиридин/вода (50/28/22)
Хлорофиллы и каротиноиды	1-пропанол/петролейный эфир (4/96) Хлороформ/петролейный эфир (30/70)

Для определения местоположения соединений хроматограммы просматривают в ультрафиолетовом свете или опрыскивают специальными растворами. Опрыскивать хроматограммы 50%-ной серной кислотой не рекомендуется, поскольку при этом разрушается бумага. Использование бумажной хроматографии в препаративных целях весьма ограничено; в тех случаях, когда такое разделение все же производится, участки хроматограммы, содержащие интересное вещество, вырезают, а затем элюируют материал с помощью соответствующих растворителей.

Как правило, при бумажной хроматографии неподвижная фаза является водной, а в качестве подвижной применяются органические растворители. Однако некоторые соединения лучше разделяются в тех случаях, когда неподвижная фаза представляет собой органический растворитель, а подвижная — воду. Хроматографическую бумагу предварительно пропитывают органическим соединением, чаще всего жидким парафином. Для этого ее погружают в раствор жидкого парафина в петролейном эфире, а затем высушивают; эфир испаряется, а бумага пропитывается парафином. После нанесения на бумагу образца проводят обычное хроматографирование с помощью водного растворителя. Этот метод применяется также и при разделении соединений методом ТСХ; он называется *хроматографией с обращенной фазой*.

3.3.2. Распределительная хроматография на колонке

В данном виде хроматографии в качестве носителя обычно применяют целлюлозу, крахмал, кремниевую кислоту или какие-либо другие соединения; неподвижная фаза, как правило, является водной. Чтобы разделение было успешным, носитель должен содержать определенное количество воды, некоторые из них — до 50% (вес/объем). Гидратированный носитель смешивают с соответствующим

щим несмешивающимся растворителем до образования суспензии. Суспензию помещают в стеклянную трубку, как и при обычной колоночной хроматографии (разд. 3.10.2). Разделяемую смесь наносят сверху и проводят хроматографирование. Вещества с разными эффективными коэффициентами распределения движутся по колонке с разными скоростями и поэтому элюируются в разное время. Следует иметь в виду, что при распределительной хроматографии на колонке может играть роль и адсорбция.

3.4. Противоточное распределение

3.4.1. Принцип метода

Этот метод разделения основан на распределении соединений между двумя несмешивающимися жидкими фазами. Он отличается от обычной распределительной хроматографии тем, что ни одна из фаз не фиксируется на сорбенте или бумаге, однако в основе его лежит тот же принцип, что и в традиционной распределительной хроматографии, а именно различие в коэффициентах распределения соединений между двумя несмешивающимися фазами. В качестве фаз для противоточного разделения применяют смеси растворителей, буферов, солей и различные комплексообразующие реагенты.

Две несмешивающиеся жидкости помещают в пробирку, а затем вносят пробу, которая распределяется между ними. Затем верхнюю фазу переносят в другую пробирку, содержащую такой же объем свежей нижней фазы; в этой пробирке также происходит перераспределение перенесенной части пробы. В первую пробирку с нижней фазой добавляют новую порцию верхней фазы, и здесь опять происходит перераспределение пробы. Таким образом, верхняя и нижняя фазы последовательно смешиваются несколько раз; после каждого такого перемешивания происходит перераспределение веществ.

В лабораторной практике для проведения такого разделения пользуются специальным *прибором для противоточного распределения* веществ, состоящим из большого количества соединенных между собой ячеек. Число переносов проб варьирует в весьма широких пределах (от 30 до 1000); благодаря особой конструкции ячеек перенос верхней фазы из одной ячейки в другую осуществляется за счет простого вращения прибора.

Как уже говорилось в разд. 3.1, коэффициент распределения вещества выражается следующим отношением:

$$\frac{\text{Концентрация растворенного вещества в верхней фазе}}{\text{Концентрация растворенного вещества в нижней фазе}}$$

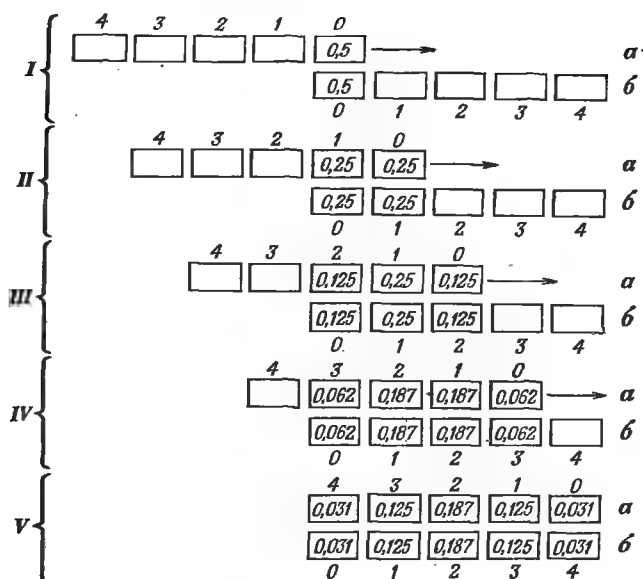


Рис. 3.5. Схема разделения веществ с помощью противоточного распределения.

Если коэффициент равен единице, то 50% вещества будет находиться в верхней фазе, а 50% — в нижней, при условии что объемы обеих фаз равны.

На рис. 3.5 наглядно изображено, как происходит противоточное распределение веществ. Прямоугольники *a* и *b* — это пробирки с верхней и нижней фазами соответственно. Пусть коэффициент распределения исследуемого вещества равен единице; тогда в ряду I после распределения вещества между равными объемами двух растворителей содержание его в обеих фазах будет равно 0,5. Если теперь перемешать верхнюю фазу, содержащуюся в пробирке 0*a*, со свежей нижней фазой в пробирке 1*b*, а нижнюю фазу 0*b* со свежей верхней фазой 1*a*, растворенное вещество распределится так, как это показано в ряду II. При последующем перемешивании содержимого пробирок 0*a* и 2*b*, 1*a* и 1*b*, 0*b* и 2*a* вещество распределится так, как это показано в ряду III. В ходе противоточного распределения этот процесс повторяется много раз. Если после восьми таких перемещений пробирок провести количественный анализ содержания растворенного вещества в каждой из них (т. е. оценку общего содержания вещества в верхней и нижней фазах), то мы получим распределение, изображенное на рис. 3.6: растворенное вещество находится во всех пробирках, однако в пробирке 4 концен-

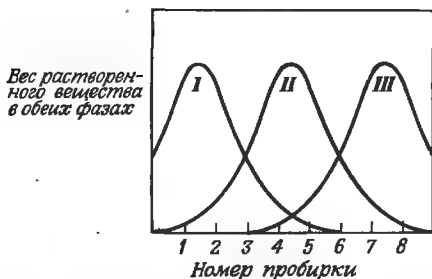


Рис. 3.6. Распределение растворенных веществ с различными коэффициентами распределения.

I — коэффициент распределения 0,3; *II* — коэффициент распределения 1,0; *III* — коэффициент распределения 3,0.

трация его максимальна. Если коэффициент распределения вещества больше или меньше 1 и равен, например, 0,3 или 3, то распределение будет выглядеть иначе (рис. 3.6).

3.4.2. Аппаратура

На рис. 3.7 показана ячейка для разделения веществ методом противоточного распределения. В каждую ячейку вносят нижнюю фазу двух несмешивающихся растворителей; затем в первую ячейку добавляют верхнюю фазу вместе с подлежащей разделению смесью.

Растворенное вещество уравнивают с обеими фазами путем перемещения ячейки из положения *A* в положение *B*. В положении *B* обе фазы разделяются, после чего ячейку переводят в положение *B*. В этом положении верхняя фаза переходит по трубке *в* в трубку *г*, а нижняя остается. По возвращении ячейки в положение *A* верхняя фаза, находящаяся в трубке *г*, из-за особой конструкции трубки *в* уже не может вернуться в уравнивающую ячейку, из которой она вышла, и переходит по трубке *д* в следующую секцию. Таким образом, за один цикл верхняя фаза проходит по одной трубке системы, где каждый раз происходит ее уравнивание. Затем в первую ячейку вносят новую порцию верхней фазы, и весь процесс повторяют сначала. Полный цикл уравнивания, отстаивания и переноса фаз обычно продолжается 1—2 мин; встряхивание и переворачивание ячеек осуществляется как ручным, так и механическим способом.

3.4.3. Применение метода

Метод широко применяется для разделения различных видов нуклеиновых кислот, в частности для очистки некоторых видов РНК и стероидных гормонов. Применение метода для разделения

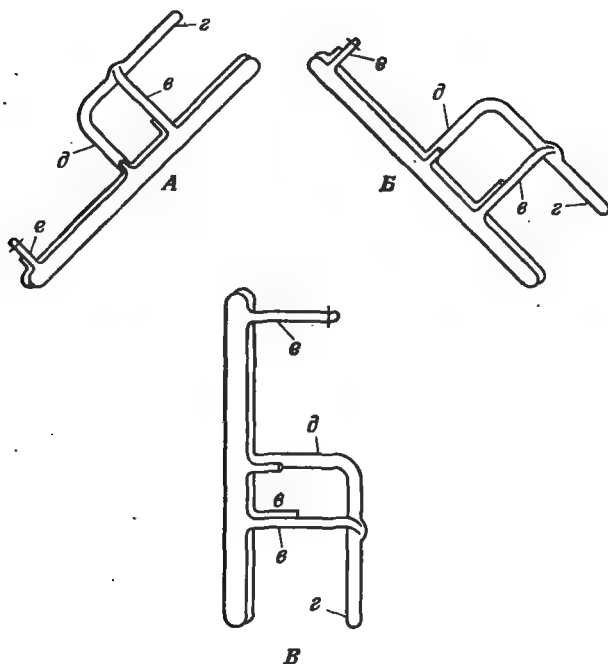


Рис. 3.7. Прибор для противоточного распределения.

аминокислот и пептидов обычно ограничивается препаративными целями, поскольку для аналитических целей существуют лучшие методы. Метод используется также для препаративного выделения антител пептидной и непептидной природы.

Для разделения клеток и клеточных частиц используется модифицированный метод противоточного распределения, основанный на распределении частиц между жидкой фазой и поверхностью раздела двух фаз. В этом случае клетки и клеточные частицы распределяются не между двумя жидкими фазами, как это имеет место при обычном противоточном распределении, а между одной фазой и границей раздела двух фаз. Эти фазы обычно представляют собой смесь растворимых в воде полимеров, таких, как декстроза или полиэтиленгликоль. Метод применяется для разделения различных штаммов бактерий, водорослей и вирусов, для отделения интактных клеточных органелл от разрушенных и для выделения различных частиц из комплексов антиген—антитело.

Для ускорения процесса разделения был создан специальный прибор для противоточного распределения в тонком слое обеих фаз, в котором время отстаивания значительно сокращено.

3.5. Газожидкостная хроматография

3.5.1. Принцип метода

Метод основан на распределении соединений между жидкой и газовой фазами и благодаря высокой чувствительности и скорости разделения используется для количественного и качественного анализа широкого круга соединений. Неподвижную фазу из «жидкого»

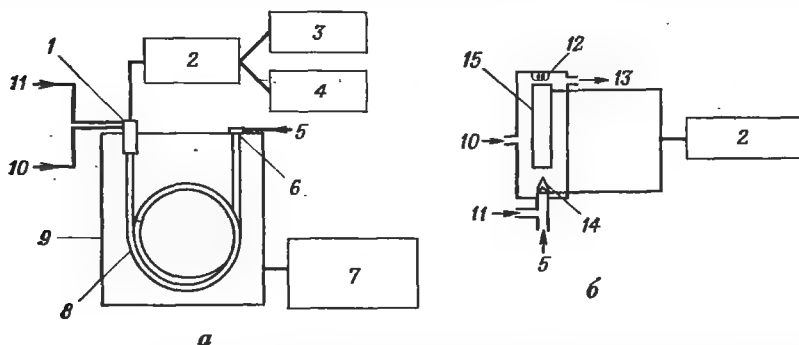


Рис. 3.8. Схема устройств прибора для газожидкостной хроматографии (а) и пламенно-ионизационного детектора (б).

1 — детектор; 2 — усилитель; 3 — самописец; 4 — интегратор; 5 — газ-носитель; 6 — место введения пробы; 7 — устройство, регулирующее температуру термостата; 8 — хроматографическая колонка; 9 — термостат; 10 — воздух; 11 — водород; 12 — запальное устройство; 13 — выходное отверстие; 14 — пламя; 15 — электрод.

материала (например, силиконовой смазки) закрепляют на инертном гранулированном твердом носителе и помещают в узкую стеклянную или стальную колонку, через которую пропускают инертный газ (подвижная фаза), например аргон или азот. Колонку помещают в термостат с температурой, при которой исследуемое вещество испаряется. В основе разделения анализируемых соединений по мере их продвижения по колонке с газом-носителем лежит различие в коэффициентах распределения испарившихся анализируемых веществ между жидкой и газовой фазами. После выхода из колонки вещества попадают в детектор, связанный через усилитель с самописцем (рис. 3.8).

3.5.2. Твердый носитель

Твердый носитель представляет собой поверхность, на которую наносят и закрепляют слой неподвижной фазы; необходимо, чтобы носитель был химически инертным по отношению к анализируемому образцу. Важно также, чтобы концентрация нанесенного слоя неподвижной фазы была достаточно высока; в противном случае об-

разец будет взаимодействовать с носителем, что ухудшит разделение. Из твердых носителей обычно применяют целит (диатомовую землю) с модифицированными гидроксильными группами. Силанизация целита (введение атомов кремния) с помощью таких соединений, как гексаметилдисилазан, уменьшает взаимодействие твердого носителя с образцом. Кроме носителя, силанизации подвергают стеклянную колонку, тампон из стеклянной ваты, а также все остальные поверхности, непосредственно контактирующие с образцом.

3.5.3. Неподвижная фаза

Неподвижная фаза должна быть нелетучей и устойчивой к температуре, при которой производится анализ. В качестве неподвижной фазы часто используют органические соединения с высокой тем-

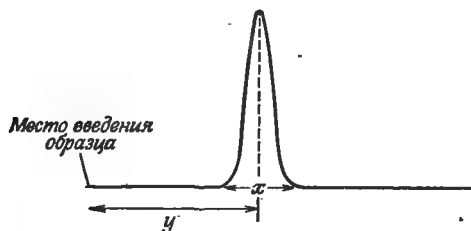


Рис. 3.9. Параметры, характеризующие газожидкостную хроматограмму. x — ширина пика у основания; y — расстояние от места введения образца до максимума пика.

пературой кипения, которые наслаивают на носитель в концентрации от 1 до 25 %, в зависимости от условий анализа. Неподвижные фазы бывают двух типов — *избирательные*, когда разделение основано на различиях в химических свойствах разделяемых компонентов, и *неизбирательные*, когда в его основе лежит различие в температуре кипения компонентов. Выбор температуры, при которой проводят анализ, зависит от природы неподвижной фазы. Слишком высокая температура вызывает испарение фазы, загрязнение детектора и искажение базовой линии. Выбор фазы зависит от природы исследуемого соединения и чаще всего основывается на литературных данных. Одну и ту же колонку можно многократно использовать в течение нескольких месяцев. В табл. 3.5 приводится перечень некоторых фаз для газожидкостной хроматографии и их применение.

Таблица 3.5

Некоторые неподвижные фазы для газожидкостной хроматографии

Неподвижная фаза	Максимальная температура, °C	Исследуемые вещества
Неопентилгликольадипат	200	Стероиды Барбитураты
Циклогександиметанолсукцинат	245	
Диэтиленгликольадипат	195	Жирные кислоты
Диэтиленгликольсукцинат	180	
Полиэтиленгликольадипат	195	
Диноилфталат	145	Эфиры, спирты
Полюоксиэтиленсорбитанмоноолеат	150	
Сорбитанмоноолеат	145	Полярные соединения
Тетраоксиэтилендиамин	125	
Бензилдифенил	100	Жирные кислоты
Апиезон L	240	Летучие амины
Сквален	145	Ароматические соединения
Силиконовое масло	250	
Полиметилсиликоновая смола	300	Жирные кислоты
Метилвинилсиликоновая кислота	290	
Метилфенилсиликоновая смола	290	Углеводороды
Метилфенилвинилсиликоновая смола	290	
Трифторпропилметилсиликон	245	Соединения с высокой температурой кипения
Диглицерин	140	
Полиэтиленгликоль 400	85	Стероиды
Полиэтиленгликоль 600	100	
Полиэтиленгликоль 1000	120	
Полиэтиленгликоль 1500	150	
Полиэтиленгликоль 20M	210	Полярные соединения

3.5.4. Наладка колонки

Для работы с колонкой необходимо знать ее эффективность (E). Эффективность колонки измеряется числом теоретических тарелок или ступеней уравнивания (разд. 3.1) и рассчитывается (рис. 3.9) по формуле

$$E = 16 \left(\frac{y}{x} \right)^2.$$

От эффективности колонки зависит скорость перемещения газаносителя; обычно она лежит в интервале 50—60 см³·мин⁻¹. Как правило, колонки имеют приблизительно 1500 теоретических тарелок на метр; естественно, что чем больше число теоретических тарелок, тем выше эффективность колонки.

3.5.5. Детекторы

Наиболее часто используемый детектор — это *пламенно-ионизационный детектор* (ПИД); он годится для анализа почти всех органических соединений и, благодаря тому что его чувствительность остается линейной в широком диапазоне концентрации, может обнаруживать вещества в количестве до 1 нг. Одним из электродов является пламя, образуемое при воспламенении поступающей в детектор смеси водорода и воздуха. Другим электродом служит медная или платиновая проволока, укрепленная в верхней части пламени (рис. 3.8). Выходя из колонки, компоненты пробы попадают вместе с газом-носителем в детектор и ионизируются в пламени, соответствующий сигнал усиливается и регистрируется на самописце. Газ-носитель, проходя через детектор, создает небольшой фон, который регистрируется самописцем в виде базовой линии.

Детектор с захватом электронов (ДЗЭ) применяется для регистрации только таких соединений, которые способны захватывать электроны (например, галогенсодержащие соединения). Этот детектор особенно удобен для анализа соединений с высоким содержанием хлора, например пестицидов, ДДТ, диэлдрин и элдрин. Детектор отличается высокой чувствительностью и может обнаруживать эти соединения в количестве до 1 пг, однако диапазон, в котором сохраняется линейность, у него гораздо уже, чем у ПИД. ДЗЭ имеет источник радиоактивного излучения (^{63}Ni), ионизирующего находящийся в колонке газ-носитель; образовавшиеся электроны создают ток между электродами, к которым приложено напряжение. Анализируемые вещества, попадая с колонки в детектор, захватывают электроны, ток уменьшается, и это изменение регистрируется самописцем.

Термоионный детектор обладает особой чувствительностью к фосфоорганическим соединениям и поэтому широко применяется для анализа фосфоорганических пестицидов. Присутствие их даже в ничтожно малом количестве резко повышает диссоциацию на ионы бромистого цезия, служащего электродом. Возникающее при этом увеличение тока усиливается и регистрируется самописцем. Недавно были созданы *азотные детекторы*, являющиеся разновидностью термоионных детекторов; у них электрод изготовлен из хлористого рубидия. Азотные детекторы обладают чувствительностью только к фосфоорганическим и азотсодержащим соединениям.

3.5.6. Параметры удерживания и качественный анализ

При стандартных условиях (температура, скорость пропускания газа-носителя и т. д.) время прохождения исследуемого соединения через колонку является величиной постоянной и называется вре-

менем удерживания. От опыта к опыту условия эксперимента несколько меняются, поэтому вместе с исследуемым образцом обычно хроматографируют стандартное соединение (так называемый внутренний стандарт); иногда такое соединение пропускают через колонку отдельно. Время выхода исследуемого соединения из колонки по отношению к таковому для стандарта называется *относительным временем удерживания* (t_R) и является постоянным для данной колонки в различных экспериментальных условиях. Поэтому при проведении качественного анализа неизвестные компоненты можно идентифицировать, сравнивая величины их t_R с таковым для уже известных соединений.

3.5.7. Внесение образца

Обычно образец растворяют в нужном растворителе и вносят раствор с помощью шприца (обычно от 0,1 до 10 мм³) в верхнюю часть колонки через специальную перегородку (диафрагму). Как правило, место внесения образца в колонку (дозатор) имеет более высокую температуру, чем сама колонка, особенно в тех случаях, когда вносят большие объемы образца или если образец имеет высокую скрытую теплоту испарения; температура поддерживается с помощью нагревательного элемента. Твердые образцы наносят на колонку посредством специальных шприцов или особых автоматических устройств.

Наряду с изотермическим методом, когда температура колонки во время всего процесса разделения поддерживается постоянной, применяется и другая методика, при которой температура колонки постепенно повышается и регулируется особым программирующим устройством. Однако при этом часто наблюдается избыточная потеря неподвижной фазы, что приводит к неконтролируемым изменениям базовой линии на самописце. В связи с этим многие системы снабжены двумя одинаковыми колонками с детекторами, одна из которых является контрольной. Проходящие через детектор токи сравнивают; при одинаковой температуре потеря вещества с обеих колонок одинакова, а при повышении температуры в одной из них избыточная потеря вещества обуславливает не равный нулю результирующий ток, который регистрируется самописцем как постоянная базовая линия.

3.5.8. Количественный анализ

Количество вещества определяют по площади (а иногда высоте) пика на диаграммной ленте самописца. Площадь пика измеряют либо планиметрическим способом, либо умножением высоты пика на ширину, которую он имеет на половине высоты. Пики можно также вырезать и взвешивать. Некоторые усовершенствованные сис-

темы для ГЖХ снабжены интеграторами, которые измеряют относительное время удерживания и определяют площади пиков. Для установления зависимости между площадью пика и количеством вещества проводят предварительную калибровку прибора с помощью стандартных соединений, концентрация которых хорошо известна.

При количественном анализе обычно используют *внутренний стандарт* — соединение, которое по физическим свойствам очень близко к исследуемому и при хроматографировании движется вдоль колонки в непосредственной близости от исследуемого соединения, но все-таки не вместе с ним. Определенное количество стандарта добавляется к исследуемому веществу на самых ранних стадиях разделения и поэтому проходит с ним все последующие стадии. Выход внутреннего стандарта определяют по заранее составленной калибровочной кривой. Поскольку любые потери стандартного соединения в ходе анализа будут равны потерям исследуемого вещества, можно рассчитать концентрацию последнего в исходном образце.

В тех случаях, когда стандартных соединений для исследуемых веществ подобрать не удастся, проводят исследования путем сочетания газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (разд. 5.9).

3.5.9. Получение химических производных проб

Некоторые соединения ввиду особой природы входящих в их состав химических групп нельзя разделять методом ГЖХ. Эти соединения удерживаются на колонке слишком долго, и для ускорения разделения стараются получить такие их химические производные, у которых значительно выше летучесть, а следовательно, и эффективный коэффициент распределения. Жирные кислоты обычно превращают в метиловые эфиры, углеводы подвергают силанизации, а аминокислоты силанизируют по карбоксильным группам или ацетилируют по аминок группам.

3.5.10. Препаративная ГЖХ

С помощью соответствующих колонок и коллекторов фракций удается получать большие количества разделяемых компонентов за счет повторной хроматографии образца. Для этого в нижней части колонки имеется система отвода, посредством которой небольшая часть газа направляется в детектор для регистрации, а остальная поступает в коллектор, где разделенные компоненты захватываются в ловушку с жидким азотом. Этот метод является особенно ценным, поскольку многие соединения удастся разделить пока только с помощью ГЖХ.

Аналогичным образом при помощи ГЖХ разделяют любые радиоактивные соединения; после разделения фракции собирают и определяют их радиоактивность.

3.6. Ионообменная хроматография

3.6.1. Принцип метода

Данный вид хроматографии основан на притяжении между противоположно заряженными частицами. В основе разделения многих биологических соединений, таких, как аминокислоты и белки, лежит тот факт, что эти соединения содержат способные к ионизации группы, которые обуславливают суммарный положительный или отрицательный заряд соединения; величина заряда зависит от рН и изоионной точки (разд. 1.2.3).

Разделение веществ с помощью ионообменной хроматографии обычно проводят на колонках, заполненных специальной *ионообменной смолой*. Существует два типа ионообменных смол — *катионообменники* и *анионообменники*. Катионообменные смолы содержат отрицательно заряженные группы, которые притягивают положительно заряженные молекулы. Эти смолы называют также *кислотными ионообменниками*, так как отрицательные заряды возникают на них в результате протолиза кислотных групп. Анионообменные смолы содержат положительно заряженные группы, притягивающие отрицательно заряженные молекулы. Их называют иногда *основными ионообменниками*, так как положительные заряды возникают, как правило, в результате связывания протонов с фиксированными основными группами.

Многие ионообменные смолы, применяющиеся для разделения биологических соединений, получают путем сополимеризации стирола и дивинилбензола (рис. 3.10).

Полистирол — это линейный полимер, растворимый в некоторых растворителях. При реакции конденсации стирола с дивинилбензолом между молекулами образуются поперечные связи (сшивки), в результате чего получается нерастворимая смола. Изменяя соотношение стирола и дивинилбензола, можно регулировать степень сшивания. Чем выше содержание дивинилбензола в сополимере по сравнению со стиролом, тем больше число поперечных связей.

При обработке поперечно-связанного полистирола концентрированной серной кислотой (сульфирование) получают сульфированную полистирольную смолу, например дауэкс 50 — сильнокислый ионообменник. SO_3H -группы ионизуются при всех значениях рН, за исключением очень низких. Сильноосновные ионообменники получают в ходе реакции между поперечно-связанным полистиролом и хлорметилowym эфиром с последующей реакцией хлорзамещенных групп с третичными аминами. $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$ -группы ио-

низуются при всех значениях рН, за исключением очень щелочных.

Катионообменные и анионообменные смолы можно разделить в зависимости от силы их кислых и основных групп. В качестве полярных групп в катионообменных смолах выступают либо $-\text{SO}_3\text{H}$ -группы (сильнокислые), либо $-\text{CO}_2\text{H}$ -группы (слабокислые). Полярными группами в анионообменниках являются третичные или чет-

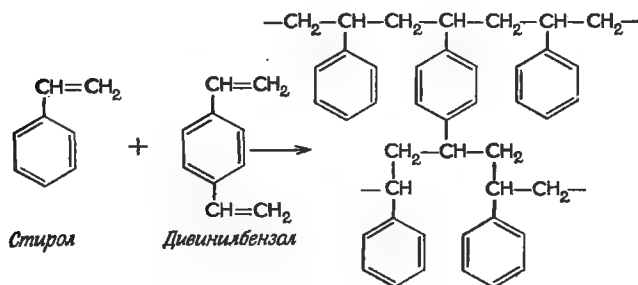


Рис. 3.10. Сополимеризация стирола и дивинилбензола.

вертичные аммонийные группы $-\text{CH}_2\text{NR}_2$ (слабоосновные) или $-\text{CH}_2\text{N}^+\text{R}_3$ (сильноосновные). В табл. 3.6 приведены некоторые имеющиеся в продаже смолы. Ряд смол со стирольной основой разрушает белки, поэтому для анализа белков лучше применять смолы с макромолекулярной акриловой решеткой.

Таблица 3.6

Типы ионообменных смол

Тип смолы	Название смолы
Слабокислая	Цеокارب 226, амберлит IRC 50, биорекс 70
Сильнокислая	Дауэкс 50, цеокارب 225, амберлит IR 120, биорад AG 50
Слабоосновная	Амберлит IR 45, деацитит Н, деацитит G, биорад AG 3
Сильноосновная	Дауэкс 1, дауэкс 2, биорад AG 1 и AG2

В буферном растворе ионообменная смола набухает, а частицы ее образуют решетчатую структуру. Смолы с большим количеством поперечных сшивок образуют матрицу, внутрь которой могут проникать лишь очень мелкие молекулы, а крупные не достигают ионообменного участка. Смолы с небольшим числом поперечных связей имеют «ячейки» большего размера, позволяющие крупным молекулам проникать внутрь гранул смолы к заряженным группам

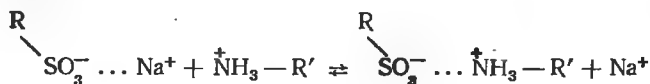
на ионообменном участке. Ионный обмен, как правило, происходит очень быстро, поэтому скорость всего процесса в целом лимитируется скоростью диффузии ионов через смолу. Таким образом, чем меньше число поперечных связей, тем быстрее ионы проникают внутрь гранул смолы и достигают ионообменного участка. Процесс ионного обмена предположительно состоит из пяти этапов.

1) Диффузия иона к поверхности смолы. В гомогенных растворах этот процесс происходит очень быстро.

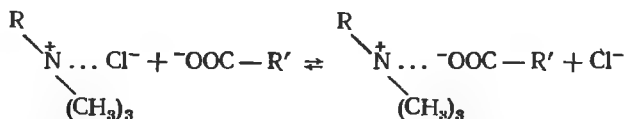
2) Диффузия иона внутрь гранул смолы к ионообменному участку. Скорость диффузии зависит от степени сшитости смолы и концентрации раствора. Эта стадия является лимитирующей для всего процесса ионного обмена.

3) Обмен ионов на ионообменном участке. Этот процесс происходит мгновенно и является равновесным.

Катионообменная смола:



Анионообменная смола:



Чем выше заряд обмениваемой молекулы, тем прочнее она связывается со смолой и тем труднее обменивается на другие ионы.

4) Диффузия обмениваемого иона через смолу к поверхности ионообменника.

5) Десорбция элюентом и диффузия обменявшегося иона в окружающий раствор.

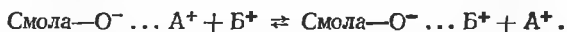
Как мы уже говорили, в буферном растворе смола поглощает воду и набухает. Набухание смолы обязательно должно закончиться до заполнения ею колонки; в противном случае этот процесс будет продолжаться в колонке, что нарушит процесс разделения. Смолу оставляют набухать в стакане с дистиллированной водой; ненабухшие мелкие частицы смолы, называемые «пылью», удаляют. Всю эту процедуру повторяют несколько раз, чтобы полностью удалить «пыль», затрудняющую протекание растворителя через колонку. Затем смолу дают отстояться вплоть до полного ее набухания. Время, необходимое для полного набухания смолы, зависит от степени ее сшитости.

Набухшую смолу помещают в колонку (разд. 3.10.2) и подвергают регенерации, пропуская через колонку 1 н. раствор HCl (в случае катионообменника) или NaOH (в случае анионообменника). Затем колонку промывают дистиллированной водой до пол-

ного удаления регенерирующего вещества, после чего колонка готова к употреблению. Отработанную смолу можно использовать повторно, для чего ее необходимо предварительно регенерировать, промыв раствором NaOH или HCl.

3.6.2. Ионообменная хроматография на колонке

Происходящий в колонке процесс можно проиллюстрировать на примере катионообменника, имеющего такую величину pH, при которой смола полностью ионизирована и насыщена катионами (A^+). Это происходит при пропускании через колонку буферного раствора, содержащего катионы A^+ . Если пропустить через колонку раствор с другими катионами (B^+), сохраняя pH таким, чтобы смола оставалась полностью ионизированной, часть катионов A^+ будет замещаться катионами B^+ вплоть до достижения равновесия.



Установившееся равновесие зависит от таких факторов, как концентрация комплекса Смола— $O^- \dots A^+$, концентрация катионов B^+ и относительное сродство ионообменного материала к катионам A^+ и B^+ . По мере прохождения через колонку раствора, содержащего катионы B^+ , непрерывно происходит процесс уравнивания, в результате чего катионы B^+ могут почти полностью связаться со смолой. При соответствующих условиях (pH, температура, ионная сила раствора, скорость протекания буферного раствора через колонку и т. д.) можно достичь того, что катионы B^+ свяжутся со смолой в определенном, небольшом участке колонки.

Чтобы элюировать катионы B^+ с колонки, через нее пропускают другой буферный раствор. Этот раствор может иметь более низкую величину pH, тогда вытеснение катионов B^+ будет происходить за счет повышения эффективной концентрации ионов водорода, или такую же величину pH, но большую ионную силу. Другой способ состоит в использовании буферного раствора с такими же pH и ионной силой, но содержащего катионы с большим сродством к ионообменнику, чем катионы B^+ .

У аминокислот, суммарный заряд которых зависит от pH, при низких значениях pH заряд каждой молекулы будет положительным, т. е. молекулы будут связываться с сильноокислой катионообменной смолой. По мере возрастания pH пропускаемого через колонку буферного раствора аминокислота постепенно теряет свой положительный заряд, и степень связывания ее со смолой ослабевает, что в конечном итоге приводит к элюированию молекул аминокислоты. Ввиду того что различные аминокислоты содержат группы с разной степенью кислотности (разд. 1.2.3), они элюируют с колонки последовательно: сначала при pH 3—4 кислые аминокислоты (аспарагиновая и глутаминовая), затем нейтральные (глицин

и аланин). Основные аминокислоты (аргинин и лизин) сохраняют свой положительный заряд и при более высоких значениях pH и элюируют с колонки последними — при pH 10—11.

Вышеперечисленные принципы лежат в основе выпускаемых промышленностью приборов для *автоматического аминокислотного анализа*, работающих по принципу, предложенному Муром и Стайном. Схема такого аминокислотного анализатора изображена на рис. 3.11.

Образец, например белковый гидролизат, поступает в анализатор через особую систему ввода и с помощью насоса подается на

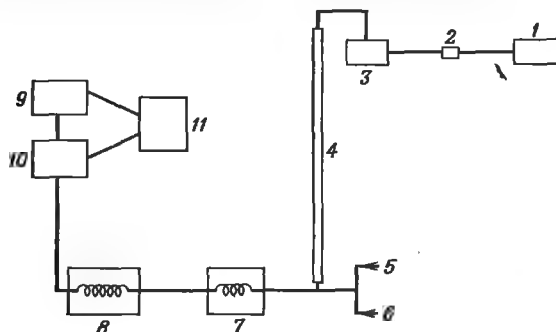


Рис. 3.11. Схема аминокислотного анализатора.

1 — градиентная камера; 2 — система подачи образца; 3 — насос; 4 — нонообменная колонка; 5 — азот; 6 — краситель; 7 — нагреватель; 8 — охлаждающий змеевик; 9 — колориметр (440 нм); 10 — колориметр (570 нм); 11 — самописец.

колонку, заполненную сильноокислым катионообменником при низком pH. Затем через колонку пропускают буферный раствор, pH и ионную силу которого постепенно повышают, смешивая в особой градиентной камере растворы с различающимися pH и ионной силой. К выходящему из колонки элюату добавляют краситель, например нингидрин, и насыщают азотом; газ стараются пропускать осторожно, чтобы не происходило слишком интенсивного перемешивания элюируемых веществ. Затем смесь нагревают на масляной бане до получения интенсивного окрашивания, охлаждают, пропуская через змеевик, и колориметрируют при 570 нм для измерения интенсивности синей окраски, обусловленной реакцией аминокислоты с нингидрином. Колориметр связан с двухканальным самописцем, который постоянно регистрирует выход элюата из колонки. Аминокислоты пролин и оксипролин окрашиваются нингидрином в желтый цвет, поэтому для регистрации этих двух аминокислот элюат пропускают через второй колориметр, настроенный на 440 нм, который также соединен с самописцем. Многие аминокислотные анализаторы имеют две колонки (вторую колонку заполняют основной анионообменной

смолой и используют для отделения основных аминокислот от аммиака).

Для разделения методом ионообменной хроматографии высокомолекулярных соединений (например, белков и нуклеопротеидов) широко пользуются модифицированной целлюлозой. Обычные смолы с большим количеством поперечных связей для этой цели не подходят, поскольку они непроницаемы для крупных молекул. Целлюлоза же, напротив, является хорошим ионообменником, во-первых, потому, что имеет волокнистую структуру, а, во-вторых, большинство функциональных групп у нее расположено на поверхности волокон, в результате чего они легко доступны для макромолекул. Особенно хорошим катионообменником является карбоксиметилцеллюлоза (КМ-целлюлоза), в которой CH_2OH -группа замещена на $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{COO}$ -группу; одним из наиболее эффективных анионообменников является диэтилдиаминоэтилцеллюлоза (ДЭАЭ-целлюлоза). В последнее время широко применяется ГЖХ на ионообменных материалах.

3.6.3. Ионообменная хроматография на бумаге

Для разделения различных соединений с успехом применяется хроматография на *ионообменной бумаге*. Эту бумагу легко получить, химически модифицировав целлюлозу. Существуют следующие виды ионообменной бумаги: ДЭАЭ-целлюлозная (сильноосновная) и КМ-целлюлозная (слабокислая), а также фосфатно-целлюлозная (сильнокислая), цитратно-целлюлозная (слабокислая) и аминоктилцеллюлозная (слабоосновная). В ряде случаев бумагу пропитывают ионообменной смолой (45% на вес смолы); такая бумага имеется в продаже, например амберлит SA-2 (сильнокислая) и амберлит SB-2 (сильноосновная).

Некоторые ионообменные материалы (например, производные целлюлозы и сефадексы) применяются также и в тонкослойной хроматографии (разд. 3.7.6).

3.7. Проникающая хроматография

3.7.1. Принцип метода

Разделение молекул по размерам и форме основано на свойствах *молекулярного сита*, которыми обладают многие пористые материалы. Наиболее часто для этой цели применяют органические полимеры с трехмерной сетчатой структурой, придающей им свойства гелей. Разделение веществ при помощи гелей, основанное на различиях в размере молекул, называется *гель-фильтрацией*. В последнее время в качестве молекулярного сита стали применять пористые стеклянные гранулы, а сам метод разделения получил название

хроматографии фильтрованием через стекло с заданным размером пор. Понятие проникающая хроматография включает в себя все виды разделения молекул, основанные на принципе молекулярного сита. В данном разделе речь пойдет в основном о гель-фильтрации, так как сам метод и его практическое применение описаны наиболее полно; однако следует иметь в виду, что вышеупомянутый метод хроматографии фильтрованием через стекло с заданным размером пор имеет с гель-фильтрацией много общего.

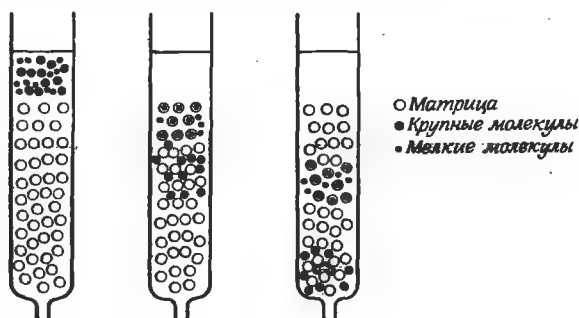


Рис. 3.12. Разделение веществ методом проникающей хроматографии.

Принцип, лежащий в основе метода проникающей хроматографии, весьма прост. Хроматографическую колонку заполняют набухшим гелем или пористыми стеклянными шариками и уравнивают с помощью соответствующего растворителя. Крупные молекулы, не проникающие в поры сита, проходят между частицами геля, в то время как небольшие молекулы «застревают» в них и движутся с меньшей скоростью. Три стадии такого разделения схематически изображены на рис. 3.12.

3.7.2. Материалы для проникающей хроматографии

К материалам для проникающей хроматографии относятся гели, в том числе и декстраны с поперечными сшивками (торговое название сефадекс), агарозные гели (сефароза, биогель А, сагавак), полиакриламидный гель (биогель Р), полиакрилоилморфин (энзокригель) и полистиролы (Био-Бидз S). Применяются также пористые стеклянные шарики (гранулы), известные под названием биоглас, и пористый кварц — порасил.

Декстрановые гели получают поперечным сшиванием полисахаридных цепочек декстрана эпихлоргидрином, благодаря чему растворимый в воде декстран становится водонерастворимым, сохраняя при этом свои гидрофильные свойства и способность к быстрому на-

буханию в водной среде. Варьируя число поперечных сшивок, удалось получить несколько различных типов сефадексов, различающихся степенью пористости частиц, что позволяет применять их для разделения веществ с различными размерами молекул. Поскольку поперечные связи между цепочками распределены произвольно, размеры пор одного и того же геля варьируют в весьма широких пределах. Это означает, что молекулы, размер которых меньше некоторого критического, могут полностью или частично проникать внутрь частиц геля. Каждый тип сефадекса характеризуется так называемой «величиной поглощения воды», т. е. количеством воды, приходящейся на 1 г сухого сефадекса в полностью набухшем геле. (табл. 3.7)

Таблица 3.7

Типы сефадексов

Тип геля	Область разделения по молекулярному весу, дальтоны	Поглощение воды, г/г сухого геля	Объем набухшего геля, см ³ /г сухого геля
G-10	до 700*	1,0	2
G-15	до 1500*	1,5	3
G-25	100—5000*	2,5	5
	1000—5000**		
G-50	500—10 000*	5,0	10
	1500—30 000**		
G-75	1000—50 000*	7,5	12—15
	3000—80 000**		
G-100	1000—100 000*	10,0	15—20
	4000—150 000**		
G-150	1000—150 000*	15,0	20—30
	5000—300 000**		
G-200	1000—200 000*	20,0	30—40
	5000—600 000**		

* Для полисахаридов с произвольной пространственной структурой.

** Для пептидов и глобулярных белков.

Гели сефадекса нерастворимы и стабильны в воде, солевых растворах и органических растворителях, а также в щелочных и слабых кислых растворах. В сильно кислых растворах может произойти гидролиз гликозидных связей матрицы геля. Однако при выдерживании сефадекса в 0,1 М растворе HCl в течение 1—2 ч его свойства не изменяются, а в растворе 0,02 М HCl сефадекс остается без изменений в течение 6 мес. Следует, однако, избегать длительного контакта геля с окисляющими агентами, поскольку это может привести к изменению его свойств. Во влажном состоянии сефадекс можно стерилизовать в автоклаве при температуре 100°C в течение 40 мин; свойства геля при этом не меняются.

Агарозные гели, приготовляемые из агара, — это линейные полисахариды, состоящие из чередующихся остатков D-галактозы и 3,6-ангидро-L-галактозы. Свойства гелей им придают водородные меж- и внутримолекулярные связи. Благодаря своей гидрофильной природе и почти полному отсутствию заряженных групп агарозные гели, подобно декстрановым, лишь в незначительной степени вызывают денатурацию и адсорбцию лабильных биохимических соединений.

Агарозные гели, отличающиеся высокой степенью пористости, хорошо дополняют декстрановые. В отличие от последних, которые применяются для фракционирования сферических молекул, таких, как глобулярные белки мол. весом примерно 800 000 или произвольно свернутые полимеры (например, декстран с мол. весом до 200 000), агарозные гели применяются для разделения молекул и частиц с молекулярным весом порядка нескольких миллионов дальтон. В связи с этим они широко используются при изучении вирусов, нуклеиновых кислот и полисахаридов.

Агарозные гели можно комбинировать с любыми водными буферами; они не разрушаются в растворах с высокой концентрацией солей, например в 7 М мочеvine, устойчивы в 95%-ном спирте и при pH от 4 до 10, а иногда и до 13. Диапазон рабочих температур — 0—30°C; при более высоких температурах гель размягчается, а замораживание вызывает необратимые нарушения его структуры.

Агарозные гели обычно представляют собой густые суспензии в дистиллированной воде, содержащей какое-либо бактериостатическое вещество, например азид натрия в концентрации 0,02%.

Таблица 3.8

Свойства некоторых сефарозных гелей

Тип	Приблизительная концентрация агарозы, %	Приблизительная область разделения (мол. вес, дальтоны)	
		полисахариды	белки
Сефароза 2В . . .	2	20 · 10 ⁶	40 · 10 ⁶
Сефароза 4В . . .	4	5 · 10 ⁶	20 · 10 ⁶
Сефароза 6В . . .	6	1 · 10 ⁶	4 · 10 ⁶

Полиакриламидные гели получают путем полимеризации акриламида и метиленбисакриламида. Изменяя соотношение между этими двумя мономерами, удается получать гели с различной степенью пористости. По своим свойствам они очень близки к декстрановым и агарозным гелям — стабильны в водных буферах в интервале

значений рН от 1 до 10, практически нейтральны и обладают одинаковой способностью связывать воду. Они имеют предел молекулярной эксклюзии в диапазоне молекулярных весов 1800—400 000 дальтон.

Вместо гелей в ряде случаев применяются пористые стеклянные шарики из боросиликатного стекла, пронизанные множеством соединяющихся между собой пор заданного диаметра; эти шарики имеют предел молекулярной эксклюзии от 3000 до 9000 000 дальтон и выполняют роль частиц обычного геля, однако обладают по сравнению с ними рядом преимуществ, а именно:

а) химически инертны ко всем реагентам, за исключением фтористого водорода и сильных оснований;

б) обладают исключительно четкими пределами эксклюзии и поэтому характеризуются большей разрешающей способностью и обеспечивают лучшее разделение;

в) дают возможность значительно сократить время подготовки колонки, поскольку не нужно тратить время на их набухание;

г) шарики не слипаются между собой, поэтому растворитель можно пропускать с большой скоростью;

д) размер пор стеклянных шариков не зависит от растворителя и рН, поэтому можно использовать любые растворители и растворители любой ионной силы, что дает возможность применять их при градиентной элюции;

е) стеклянные шарики легко промывать и стерилизовать.

3.7.3. Гель-фильтрация; теоретические основы

Способность молекул анализируемого соединения проникать в растворитель, поглощенный частицами набухшего геля, зависит от степени пористости частиц геля и от размера молекул соединения. Распределение вещества на колонке, заполненной набухшим гелем, зависит от общего объема растворителя внутри и снаружи частиц геля.

Для данного вида геля распределение анализируемого вещества в растворителе внутри и снаружи частиц геля определяется *коэффициентом распределения* K_d , который зависит от размера молекул вещества. Если молекулы крупные, в растворителе внутри частиц геля их не будет совсем; величина K_d в этом случае равна 0. Если молекулы вещества достаточно малы и могут беспрепятственно проникать внутрь частиц геля, K_d будет равен 1. Поскольку размеры пор варьируют, молекулы среднего размера будут проникать в растворитель, находящийся в порах, лишь частично; следовательно, величина K_d в этом случае будет лежать между 0 и 1. Это позволяет разделять на данном геле вещества, молекулярные веса которых различаются лишь весьма незначительно.

Объем выхода (т. е. объем элюата, собранного с момента внесения вещества на колонку до момента выхода его с колонки) V_e определяется объемом растворителя между гранулами геля V_o (так называемым внешним объемом), коэффициентом распределения вещества и объемом растворителя внутри частиц геля V_i . Таким образом,

$$V_e = V_o + K_d \cdot V_i \quad (3.1)$$

Внутренний объем V_i можно рассчитать, исходя из известного сухого веса геля a и величины поглощения воды W :

$$V_i = aW. \quad (3.2)$$

Численное значение V_e для данного вещества варьирует в зависимости от размера колонки, в то время как коэффициент распределения K_d является величиной постоянной и от геометрии колонки не зависит.

Если два вещества имеют различающиеся молекулярные веса и разные K_d (обозначим их через $K_{d'}$ и $K_{d''}$), то разность объемов выхода V_s будет определяться следующим уравнением:

$$\begin{aligned} V_s &= V_{e'} - V_{e''} = (V_o + K_{d'} V_i) - (V_o + K_{d''} V_i), \\ V_s &= (K_{d'} - K_{d''}) V_i. \end{aligned} \quad (3.3)$$

Таким образом, для полного разделения двух веществ необходимо, чтобы объем исследуемого образца не превышал V_s . Поскольку на практике условия разделения отличаются от идеальных (например, из-за неправильного заполнения колонки), объем образца должен быть несколько меньше величины V_s ; от соотношения между объемом образца и внутренним объемом V_i зависит как точность разделения, так и степень разведения образца. Для расчета оптимального объема столбика геля пользуются уравнениями (3.1)* и (3.2).

3.7.4. Гель-фильтрация; указания к проведению эксперимента

При гель-фильтрации, как и при других видах хроматографии, необходимо пользоваться эффективными колонками, особенно в тех случаях, когда разделяют вещества с близкими значениями K_d . Объем наносимого образца должен быть по возможности небольшим; необходимо следить, чтобы в ходе элюции не происходило чрезмерного разведения или перемешивания уже разделенных компонентов.

На основании характеристик различных гелей, приведенных в табл. 3.7 и 3.8, и исходя из литературных данных о значении K_d

для каждого конкретного случая можно выбрать тот или иной тип геля. Если необходимым требованиям одновременно удовлетворяют несколько гелей, то целесообразно выбирать гель с наименьшей величиной поглощения воды, т. е. с наибольшим числом поперечных связей.

Большинство гелей выпускают двух типов — грубый и тонкий; они различаются по размеру частиц (300—100 мкм и 80—20 мкм в сухом состоянии соответственно). Тонкие гели более эффективны, поскольку уравнивание колонки в этом случае наступает быстрее; однако скорость протекания растворителя через колонку с тонким гелем относительно низка. Многие гели выпускают также в виде бусинок, что дает возможность значительно повысить скорость протекания растворителя; таким образом, бусинки представляют собой улучшенную модификацию более ранних типов порошкообразных гелей.

Перед заполнением колонки гель должен полностью набухнуть. Для этого навеску геля выдерживают в воде или лучше в слабом солевом растворе. В результате электростатического притяжения отдельные частицы геля могут слипаться; в растворах электролитов этого не происходит. Все гели набухают довольно быстро, однако для достижения равновесия все же требуется какое-то время. Это в первую очередь относится к гелям пористого типа: так, например, сефадексы G-25 и G-50 набухают в течение 8—10 ч, сефадекс G-75 — в течение суток, а сефадекс G-100 — 2 сут; для набухания сефадекса G-200 требуется не менее 3 сут. Если не дать гелю предварительно набухнуть, то окончательное набухание произойдет после внесения его в колонку, что значительно снизит скорость протекания растворителя из-за слишком плотной набивки колонки.

Время набухания можно сократить до нескольких часов, нагревая суспензию геля в кипящей водяной бане в течение 1—5 ч (продолжительность нагревания зависит от типа геля). Колонку заполняют набухшим гелем, а затем обычным способом наносят образец (разд. 3.10.2 и 3.10.3), компоненты которого при непрерывном добавлении элюирующего раствора проходят через колонку. Элюат, объем которого измеряется с момента внесения в колонку образца, собирают в виде фракций, каждую из которых затем анализируют (разд. 3.10.7). Внешний объем определяют как объем, в котором из колонки выходит высокомолекулярное вещество, совершенно не проникающее в частицы геля (например, голубой декстран — высокомолекулярный полисахарид). Определив объем выхода данного вещества, можно рассчитать его коэффициент распределения.

После элюирования из колонки всех компонентов исследуемого вещества гель можно использовать для дальнейших экспериментов без дополнительной регенерации.

3.7.5. Тонкослойная гель-фильтрация (ТГФ)

Тонкослойная гель-фильтрация имеет ряд общих черт с ТСХ, но между ними имеется также и существенное различие. При ТГФ слой набухшего геля наносят на поверхность стеклянной пластинки. Гранулы геля прилипают к пластинке без добавления закрепляющих агентов, образуя неподвижную фазу; подвижной фазой является буферный раствор. В отличие от ТСХ, при ТГФ слой геля не должен подсыхать; следовательно, в ТГФ «фронт» растворителя отсутствует. Пластинку для ТГФ помещают в герметичную камеру и соединяют с обеих сторон с резервуарами при помощи «мостиков» из фильтровальной бумаги. Пластинку устанавливают под углом 20° , что облегчает прохождение подвижной фазы через слой. Для уравнивания требуется не менее 12 ч. Цель уравнивания — установить правильное соотношение между объемами подвижной и неподвижной фаз. Пластинку можно располагать горизонтально, а резервуары с растворителем помещать на разной высоте, благодаря чему будет обеспечиваться ток растворителя. Пробу наносят в виде пятна или полосы, а затем в течение определенного времени проводят хроматографирование.

В то время как ТСХ применяют в основном для разделения аминокислот, сахаров и олигосахаридов, алкалоидов, стероидов и липофильных соединений, ТГФ используется для анализа высокомолекулярных гидрофильных соединений — белков, пептидов, нуклеиновых кислот, требующих более тонкой процедуры разделения.

Основным преимуществом ТГФ перед гель-фильтрацией на колонке является то, что она позволяет хроматографировать в одинаковых условиях одновременно несколько проб, а также разделять очень малые количества материала, что делает ее незаменимой в клинических лабораториях.

3.7.6. Применение проникающей хроматографии

Очистка вещества. Проникающая хроматография используется в основном для очистки высокомолекулярных биологических соединений. С помощью соответствующих гелей или стеклянных гранул проводят разделение и очистку вирусов, белков, ферментов, гормонов, антител, нуклеиновых кислот и полисахаридов. Методом проникающей хроматографии можно разделять смеси низкомолекулярных соединений, отделять аминокислоты от пептидов, фракционировать пептиды, образующиеся в результате частичного гидролиза белков, а также олигонуклеотиды из гидролизатов нуклеиновых кислот. Используя данный метод, можно выделять низкомолекулярные декстраны из смесей, например из кукурузного масла.

Определение молекулярных весов. Установлено, что в широком диапазоне молекулярных весов объем элюата глобулярных белков

линейно зависит от логарифма молекулярного веса. На основании этого строят калибровочную кривую для белков с известным молекулярным весом и структурой, аналогичной структуре исследуемых белков, и с помощью этой кривой определяют молекулярные веса неизвестных белков.

Концентрирование растворов. Растворы высокомолекулярных соединений можно концентрировать путем добавления к ним сухого сефадекса G-25 (грубого). Набухающий гель поглощает воду и низкомолекулярные соединения, а вещества с большим молекулярным весом остаются в растворе. Спустя 10 мин гель удаляют центрифугированием; при этом pH и ионная сила раствора остаются неизменными.

Обессоливание растворов. С помощью колонки, заполненной сефадексом G-25, можно проводить обессоливание растворов высокомолекулярных соединений. Фракции высокомолекулярных соединений элюируются с внешним объемом колонки, в то время как фракции, содержащие низкомолекулярные соединения, распределяются между подвижной и неподвижной фазами и поэтому движутся с меньшей скоростью. Обессоливание — более быстрый и эффективный метод, чем диализ, и используется, в частности, для удаления фенола из растворов нуклеиновых кислот, сульфата аммония из растворов белков, а также для отделения моносахаридов от полисахаридов и аминокислот от белков.

Первоначально сефадексы применяли только в гель-фильтрации, однако в настоящее время имеются их модификации, которые с успехом используются как ионообменные смолы. К ним относятся: ДЕАЭ-сефадекс (слабоосновный), КМ-сефадекс (слабокислый) и SE-сефадекс (сульфэтил, сильнокислый). Эти виды сефадексов также бывают с разным числом поперечных связей; разделение веществ с их помощью основано на ионном обмене и гель-фильтрации.

3.8. Аффинная хроматография

3.8.1. Принцип метода

Очистка высокомолекулярных биологических соединений методом аффинной хроматографии основана на уникальном свойстве макромолекул — их *биологической специфичности*. Именно благодаря этой особенности с помощью аффинной хроматографии теоретически можно получать абсолютно чистые вещества в отличие от таких методов разделения, как проникающая хроматография и электрофорез, основанных на физико-химических свойствах макромолекул (которые у отдельных молекул могут быть практически одинаковыми).

До настоящего времени аффинная хроматография применялась в основном для очистки белков, но ее в равной степени можно ис-

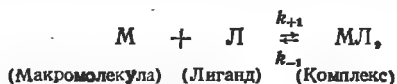
пользовать и для очистки антигенов и антител, витаминов и гормонов, белков, связывающих лекарственные вещества, рецепторов лекарственных веществ, транспортных белков, полирибосомальных и полиферментных комплексов и репрессоров.

Характерной особенностью третичной структуры ферментов является то, что их активный центр и регуляторный участок (один или несколько) взаимодействуют лишь с небольшим числом соединений (лигандов), которые являются либо субстратами, либо эффекторами обратимого или необратимого типа. Очистка ферментов с помощью аффинной хроматографии основана на специфическом узнавании этих участков и возможна лишь в том случае, если активный участок обладает высоким сродством к лиганду, если связывание лиганда с участком обратимо и если в данных условиях после сшивания лиганда с матрицей никакой другой реакции не происходит.

Сначала лиганд, который обычно представляет собой конкурентный обратимый ингибитор, ковалентно сшивают с соответствующей нерастворимой матрицей; при этом лиганд не теряет своей способности связываться с ферментом. Затем подлежащий очистке раствор фермента наносят на колонку, заполненную связанной с лигандом матрицей в соответствующем буферном растворе, после чего происходит избирательное связывание фермента. Содержащиеся в ферменте примеси, которые не связались с матрицей, элюируются с колонки; последующую элюцию фермента осуществляют при помощи раствора, содержащего субстрат, в среде с другим рН и (или) ионной силой.

Для разделения веществ методом аффинной хроматографии необходимо точно знать кинетические свойства исследуемого фермента, так как успех анализа прежде всего зависит от тщательной подготовки эксперимента. Экспериментальные условия должны быть максимально приближены к условиям анализа ферментов в обычных изолированных системах.

Следует иметь в виду, что при очистке всех видов макромолекул методом, в основе которого лежит процесс



эффективность очистки зависит от природы образующегося комплекса. По мере нанесения на колонку новых порций раствора исследуемого соединения и в силу обратимости процесса будет происходить связывание других макромолекул, задержавшихся в верхней части колонки и еще не успевших прочно связаться с лигандом. В результате этого увеличивается не только концентрация, но и прочность образующегося комплекса, что в свою очередь повышает эффективность очистки. Благодаря постоянному повышению эф-

фективности процесса по мере нанесения на колонку образца, аффинная хроматография неизменно дает лучшие результаты по сравнению с традиционными методами.

3.8.2. Выбор нерастворимой матрицы

Идеальная нерастворимая матрица для аффинной хроматографии должна удовлетворять следующим требованиям:

а) содержать большое число химических групп, способных ковалентно связываться с лигандом, и при сшивании с ним не разрушаться;

б) не разрушаться при связывании и последующей элюции макромолекул;

в) как можно слабее взаимодействовать с другими макромолекулами, чтобы неспецифическое связывание было минимальным;

г) обеспечивать быстрое протекание растворителя.

Обычно в качестве матрицы применяют однородные твердые сферические гранулы таких соединений, как агароза и поперечно-сшитые декстраны (например, сефароза 4В); применяются также синтетические полиакриламидные гели, производные целлюлозы, полистирольные смолы и пористые стеклянные шарики.

3.8.3. Выбор лиганда и его сшивание с матрицей

Чтобы правильно выбрать лиганд, нужно хорошо знать специфичность подлежащих очистке макромолекул. Лиганд должен содержать определенную химическую группу, которая не участвует в специфическом связывании лиганда с макромолекулой, но посредством которой происходит его сшивание с матрицей. Чтобы в процессе сшивания с матрицей не нарушалась способность лиганда связываться с макромолекулой, целесообразно связывать лиганд с матрицей с помощью удлиняющих «мостиков».

Наиболее распространенный способ пришивания лиганда к матрице заключается в предварительной обработке полисахаридной матрицы бромцианом (CNBr) при pH 11,0 (в продаже имеется активированная бромцианом сефароза 4В).

Бромциан реагирует с гидроксильными группами полисахарида с образованием карбаматных групп, а также с соседними гидроксильными группами (если они имеются) с образованием имидокарбонатных групп. Одновременно происходит, по-видимому, образование поперечных связей внутри матричной структуры геля, что способствует ее стабилизации. Удлиняющие «мостики» вводят несколькими способами, в частности при помощи диаминов типа $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_x\text{NH}_2$ ($x = 2-6$) или ϵ -аминокапроновой кислоты. Окончательное сшивание замещенной матрицы с лигандом, который должен содержать определенную реакционноспособную группу (как

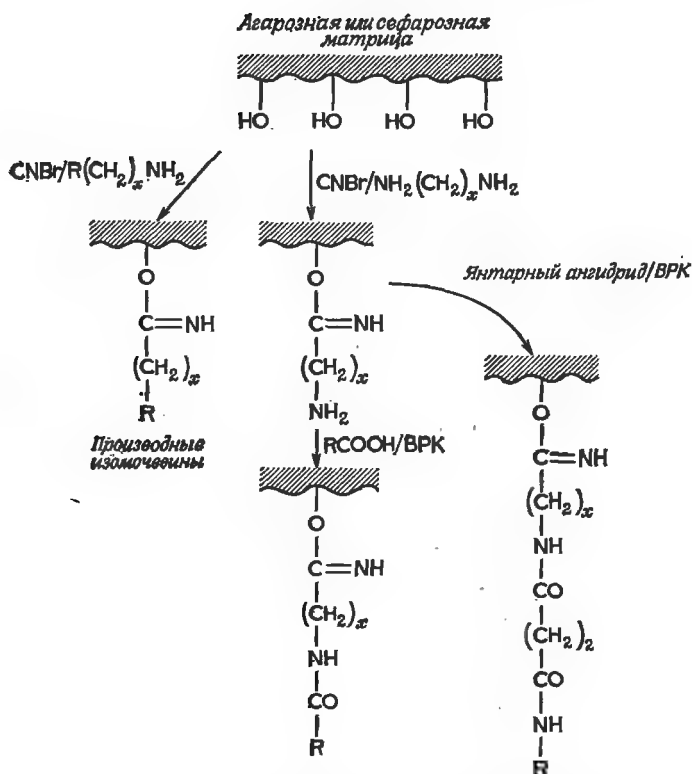


Рис. 3.13. Возможные пути сшивания лиганда с агарозой или сефарозой. Буквой *R* обозначен лиганд, с которым связывается макромолекула, символом ВРК обозначен водорастворимый карбодимид. Для простоты приведена реакция только с одной из гидроксильных групп.

правило, amino- или карбоксильную группу), осуществляется при помощи соответствующих методов органического синтеза. Иногда удлиняющий «мостик» является частью самого лиганда; в этом случае он непосредственно пришивается к матрице с помощью бромциана. Некоторые из возможных реакций сшивания лиганда с матрицей приведены на рис. 3.13.

3.8.4. Адсорбция и элюция при аффинной хроматографии на колонке

Колонка для аффинной хроматографии заполняется связанной с лигандом матрицей и уравнивается тем же буферным раствором, который используется для растворения исследуемого соединения. Буферный раствор должен иметь такие pH и ионную силу, чтобы обеспечивать оптимальные условия для сшивания лиганда с

белком. После нанесения исследуемого препарата и связывания макромолекул колонку промывают другими буферными растворами для удаления неспецифически адсорбированных примесей, а затем элюируют макромолекулы.

Характер элюции зависит исключительно от константы скорости k_{-1} . Если сродство макромолекулы к лиганду высоко, то даже в самых благоприятных условиях элюция будет протекать довольно медленно (1—2 ч). Обычно в элюирующий раствор добавляют свободный субстрат или ингибитор, что предотвращает повторное связывание макромолекул с лигандом. Лучше всего проводить элюцию при комнатной температуре (или температуре несколько выше комнатной) и время от времени прекращать пропускание растворителя. Обычно рН и (или) ионную силу элюирующего раствора направленно изменяют, добавляя такие реагенты, как 0,1 М раствор уксусной кислоты или гидроокись аммония. При этом происходят небольшие изменения конформации макромолекул, способствующие высвобождению лиганда, но не вызывающие их денатурации.

3.8.5. Применение аффинной хроматографии

Лучшим доказательством огромных возможностей данного метода является постоянное увеличение числа ферментов и других белков, очистку которых проводят методом аффинной хроматографии. Характерно, что в число таких ферментов входят и некоторые аллостерические ферменты, такие, например, как глутаминсинтетаза. Кроме того, аффинная хроматография применяется для очистки антител, антигенов и нуклеиновых кислот. Одной из важнейших областей применения метода становится изучение гормонов и рецепторов лекарственных веществ, а также сложных клеточных структур, анализ которых до настоящего времени был в значительной степени затруднен.

В последние годы все большее применение в лабораторной практике и в промышленности находят так называемые *ферменты в твердом состоянии*. Ферменты, иммобилизованные путем ковалентного связывания с нерастворимой матрицей (подобно тому, как это делается в аффинной хроматографии), обладают неоспоримыми преимуществами по сравнению со свободными ферментами. Они гораздо более термостабильны, обладают высокой устойчивостью к протеолизу и могут использоваться на колонке. В этом состоянии они сохраняют свою каталитическую способность при пропускании через колонку растворов, содержащих субстрат, что в конечном итоге приводит к получению свободного от фермента продукта и позволяет повторно использовать фермент. Регенерировать неослободившийся фермент без потери его активности можно также с помощью фильтрации или центрифугирования.

3.9. Жидкостная хроматография под высоким давлением

В последние годы появились приборы, позволяющие проводить разделение соединений методом хроматографии под высоким давлением. В этом случае неподвижную фазу помещают в узкую стальную колонку, в которую затем под давлением нагнетают подвижную жидкую фазу. Применение высокого давления позволяет использовать значительно более длинные колонки и одновременно существенно сокращать время разделения. Метод универсален, поскольку может применяться во многих видах хроматографического разделения: адсорбционной хроматографии, распределении в системе жидкость—жидкость, а также ионообменной и гель-проникающей хроматографии. Оборудование для жидкостной хроматографии под давлением включает обычно одну или несколько детекторных систем для непрерывной регистрации выхода элюата из колонки.

3.10. Общие приемы хроматографии на колонке

В этом разделе рассматриваются некоторые наиболее важные вопросы, связанные с практическим применением метода хроматографии на колонке—одного из самых распространенных методов практической биохимии.

3.10.1. Колонка

Стеклоплатовая хроматографическая колонка должна быть устроена таким образом, чтобы неподвижная фаза доходила до самого ее дна, т. е. чтобы «мертвое пространство» у основания колонки было минимальным; в противном случае уже разделившиеся частицы будут скапливаться на дне и перемешиваться. Для этого в основание фирменных колонок впаивают, например, пористую стеклянную пластинку, на которую помещают съемную сетку из нейлона, а затем наносят неподвижную фазу. Другой, еще более простой и дешевый способ состоит в том, что на дно колонки кладут тампон из стеклянной ваты с небольшим количеством кварцевого песка или мелких стеклянных шариков. При выходе из колонки элюат через систему капилляров поступает в детектор и (или) в коллектор фракций (рис. 3.14). Если в ходе разделения необходимо поддерживать постоянную температуру, можно надевать на колонку термостатируемую «рубашку», внутри которой циркулирует жидкость, подаваемая из термостата при помощи насоса.

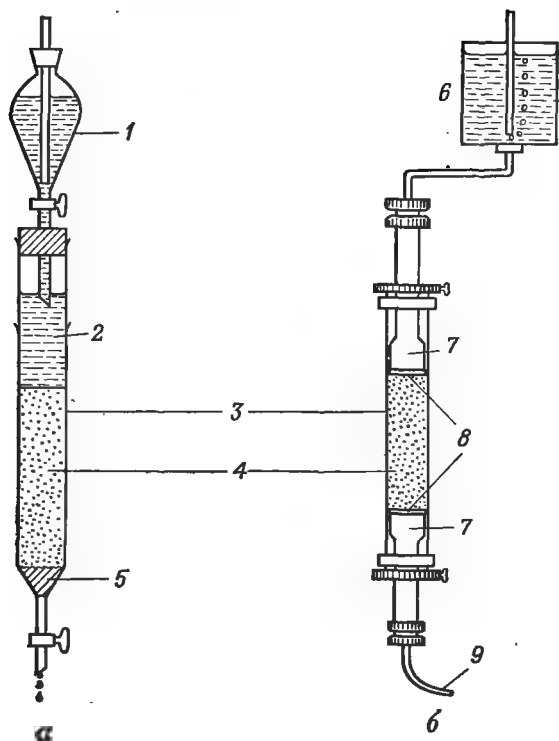


Рис. 3.14. Хроматографическая колонка: упрощенный (а) и усовершенствованный (б) варианты.

1 — резервуар; 2 — элюирующий раствор; 3 — стеклянная колонка; 4 — наполнитель; 5 — стеклянная вата; 6 — сосуд Мариотта с элюирующим раствором; 7 — регулируемый поршень; 8 — сетка из нейлона; 9 — капиллярный шланг, соединенный с регистрирующим устройством и (или) коллектором фракций.

3.10.2. Заполнение колонки

От правильного заполнения колонки в значительной степени зависит успех разделения. Кашицеобразную суспензию сорбента, смолы или геля в подходящем растворителе осторожно вносят в колонку при закрытом кране; верхний слой суспензии перемешивают, а стенки колонки слегка простукивают, что способствует удалению попавших в колонку пузырьков воздуха и равномерному ее заполнению. Колонку заполняют суспензией до требуемой высоты, а затем открывают кран и пропускают растворитель. По мере вытекания растворителя содержимое колонки постепенно уплотняется. Для проведения этой процедуры и получения воспроизводимых

результатов требуется немалый опыт. Чтобы уменьшить взмучивание верхнего слоя наполнителя при внесении в колонку образца, над ним обычно помещают кружок фильтровальной бумаги или прокладку из нейлона или шелка. Некоторые фирменные колонки снабжены адаптором и поршнем, которые служат не только для предохранения верхней части колонки от повреждений, но и для ввода растворителя, обычно с помощью системы капиллярных шлангов. Необходимо следить за тем, чтобы заполненная колонка не высыхала; для этого над наполнителем должен всегда находиться слой растворителя. От правильного выбора соотношения между высотой колонки и диаметром и высотой и общим объемом наполнителя зависит количество материала, которое можно разделить; к сожалению, сказать заранее, каким должно быть это соотношение, трудно; определить его можно только путем проб и ошибок, хотя здесь накоплен уже значительный опыт — установлено, например, что для эффективного разделения частиц методом гель-фильтрации соотношение высоты колонки и ее диаметра лежит в пределах 10:1—20:1.

3.10.3. Внесение образца

Образец можно наносить на колонку несколькими способами. Самый простой из них состоит в следующем. Избыток растворителя отсасывают из верхней части колонки пипеткой, а остатку дают впитаться в наполнитель. Затем при помощи пипетки осторожно наносят образец и также дают ему впитаться; остатки образца смывают со стенок колонки небольшой порцией растворителя. После этого колонку заполняют свежим растворителем, создавая слой в 5—10 см, и соединяют с резервуаром, который находится над колонкой и содержит большой объем растворителя, что позволяет поддерживать нужный слой растворителя в колонке. Другой способ внесения образца, при котором избыток растворителя остается в колонке, состоит в увеличении плотности наносимого раствора образца путем добавления раствора сахарозы до концентрации 1%. Когда такой раствор насливают поверх растворителя, он опускается вниз, а затем быстро впитывается в наполнитель колонки. Вполне естественно, что данный способ применим лишь в тех случаях, когда сахара никак не влияет на ход разделения и не мешает последующему анализу образца. Третий способ заключается в нанесении образца непосредственно на поверхность наполнителя при помощи капилляра, шприца или перистальтического насоса.

Необходимо следить за тем, чтобы колонка не была перегружена образцом, в противном случае разделение может быть некачественным. Рекомендуется вносить образец в небольшом объеме растворителя. Это позволяет сосредоточить разделяемые частицы в уз-

кой полосе уже в самом начале разделения. Чтобы избежать аномальной адсорбции, перед нанесением на колонку образец обессоливают.

3.10.4. Протекание элюирующего раствора

Скорость протекания элюирующего раствора через колонку в ходе разделения должна быть постоянной. Наиболее простой способ достижения этого — подача элюирующего раствора самотеком. Скорость можно регулировать, изменяя рабочее давление, которое определяется высотой столба жидкости от уровня ее в резервуаре, расположенном над колонкой, до выходного отверстия колонки. Обычные открытые резервуары для этой цели не подходят, поскольку по мере вытекания из них растворителя рабочее давление уменьшается. Чтобы этого не происходило, пользуются сосудом Мариотта (рис. 3.14). Постоянную скорость протекания элюирующего раствора можно поддерживать и при помощи перистальтического насоса; однако при работе с ним следует соблюдать осторожность, так как применение слишком высокого давления приводит к чрезмерному уплотнению наполнителя и нарушению структуры колонки.

3.10.5. Градиентная элюция

Часто разделение на колонке проводят с помощью раствора, рН, ионную силу или полярность которого меняют. Для создания градиента смешивают два растворителя в требуемых пропорциях, пользуясь либо фирменными приборами, либо более простым устройством, состоящим из двух сообщающихся камер. Обе камеры, одна из которых (смеситель) соединена с колонкой, а другая (резервуар) соединена посредством сифона со смесителем, заполняют соответствующими растворами. По мере поступления раствора из смесителя на колонку убыль его восполняется равным объемом поступающего из резервуара в смеситель раствора, где он перемешивается при помощи мешалки. Направление градиента определяется соотношением величин рН, ионной силы и полярности растворов в резервуаре и смесителе. Характер полученных градиентов, которые могут быть линейными, «выпуклыми» или «вогнутыми», зависит от соотношения диаметров обеих камер.

3.10.6. Сбор фракций

Элюируемый с колонки раствор (элюат) собирают в виде небольших фракций, каждая из которых составляет 2—5% общего объема колонки. Фракции обычно собирают в пробирки, так что после

выхода из колонки разделенные компоненты не смешиваются. Каждое соединение обычно распределено по нескольким пробиркам, однако если разделение проведено успешно, число таких фракций относительно невелико и они отделены от других соединений промежуточными фракциями, содержащими ничтожно малые количества разделяемых соединений. Фракции, содержащие одно и то же соединение, объединяют для дальнейшего анализа.

Существует целый ряд автоматических коллекторов фракций, с помощью которых можно собирать определенные объемы элюата в автоматически сменяющие друг друга пробирки. Точное количество элюата в каждой фракции задается несколькими способами. Фракции можно собирать в пробирки либо по заранее заданному объему (с помощью системы сифонов или заменяющих их устройств), либо по числу капель — при помощи специального электронного устройства, контролирующего заполнение пробирок запрограммированным числом капель. Недостаток последнего метода заключается в том, что при изменении концентрации элюата (как это имеет место при градиентной элюции) изменяется поверхностное натяжение капель, а следовательно, и их объем; при этом изменяется также и объем собираемых фракций. Другой способ заключается в том, что элюат собирают в каждую пробирку в течение определенного интервала времени. Однако и в этом случае объем отдельных фракций может быть неодинаковым, так как скорость протекания элюата по колонке не всегда постоянна.

3.10.7. Анализ фракций

Анализ распределения разделенных компонентов в собранных фракциях проводят с помощью методов, позволяющих специфически обнаруживать разделяемые соединения. Очень часто все фракции, число которых может превышать 100, приходится исследовать вручную. Однако, если соединение обладает какими-либо характерными физическими свойствами, например поглощает свет в видимой или ультрафиолетовой областях спектра, выходящий из колонки элюат можно исследовать на содержание в нем данного соединения с помощью соответствующего прибора. Этот метод широко используется при анализе белков и нуклеиновых кислот, поглощающих свет при 280 и 260 нм соответственно. В этом случае элюат отводят из колонки с помощью капиллярных трубок в кварцевую проточную кювету, на которую падает луч света соответствующей длины волны. Изменения поглощения растворов регистрируют фотозлементом и фиксируют на диаграммной ленте самописца, который можно синхронизировать с коллектором фракций. Таким образом, осуществляется непрерывная запись номеров фракций и количества содержащегося в каждой из них вещества.

3.11. Разделение веществ с помощью мембран и полых волокон

3.11.1. Принцип метода

В биохимической практике часто возникает необходимость сконцентрировать водные растворы макромолекул и удалить из них мелкие неорганические ионы. Иногда для этих целей применяют сухой гель, например сефадекс G-25 (разд. 3.7.6), однако самый распространенный способ концентрирования веществ — использование специальных мембран. Такие мембраны обладают хорошей проницаемостью для небольших молекул и практически непроницаемы для крупных. Диффузия небольших молекул через мембраны обеспечивается следующими факторами:

а) разностью концентраций подлежащего удалению вещества в исследуемом растворе и чистом растворителе, находящихся по разные стороны мембраны (*диализ*);

б) разностью гидростатических давлений по обе стороны мембраны, обеспечивающей диффузию молекул растворителя через мембрану (*ультрафильтрация*);

в) при переносе ионов через мембрану — приложенным внешним электрическим полем (*электродиализ*).

В каждом из вышеперечисленных случаев раствор диффундирующего через мембрану вещества условно называется ультрафильтратом.

Наиболее часто используемые мембраны — это прозрачные целлюлозные пленки или трубки (например, трубочки из целлофана или микротрубки Вискинга). Недавно были получены мембраны из нецеллюлозных полиэлектролитных комплексов (ультрафильтры диафло, выпускаемые фирмой Amicon Ltd.), полупроницаемые полые волокна из целлюлозы и ацетатцеллюлозы (биофайбер, выпускаемые фирмой Bio-Rad Laboratories) и нецеллюлозные полиэлектролитные комплексы (диафайбер, фирма Amicon Ltd.). Полые волокна, аналогично мембранам, также действуют по принципу молекулярного сита, однако обладают по сравнению с ними рядом преимуществ, обусловленных увеличением площади фильтрации за счет увеличения соотношения между площадью поверхности волокон и их объемом.

3.11.2. Разделение с помощью мембран

В продаже имеются целлюлозные мембраны различной степени проницаемости и целлюлозные трубки с различным диаметром пор. Степень пористости мембран можно изменять путем механического растягивания их или обработкой раствором едкого натра, а также за счет добавления к исследуемому раствору следовых количеств

поверхностно-активных веществ. Сорбция этих веществ на «активных участках» мембран, по-видимому, вызывает изменение их адсорбционных и электрохимических свойств. В отличие от целлюлозных мембран ультрафильтры диафло представляют собой анизотропные мембраны, состоящие из очень тонкой, но прочной пористой пленки-оболочки с заданным размером пор, которая прикреплена к более толстой губчатой подложке из того же полимера с постепенно расширяющимися отверстиями. Благодаря такой необычной структуре мембран поры почти не засоряются, что обеспечивает высокую скорость прохождения раствора через мембрану. Мембраны применяются исключительно для ультрафильтрации и выпускаются с различным диаметром пор.

Диализ. Чтобы удалить из исследуемого раствора молекулы растворенного вещества, его помещают в целлюлозный мешочек и погружают в чистый растворитель (воду или буферный раствор). Малые молекулы будут выходить из мешочка в растворитель до тех пор, пока их концентрации по обе стороны мембраны не выравняются. Для ускорения диффузии площадь поверхности диализного мешочка делают как можно большей, помня, однако, о возможной потере макромолекул в результате сорбции их на мембране, а слои раствора, примыкающего к мембране, постоянно заменяют, перемешивая растворитель, а иногда и раствор. Рекомендуется также регулярно, а еще лучше непрерывно сменять растворитель.

Если осмотическое давление в исследуемом растворе и растворителе неодинаково, то по мере выхода из диализного мешочка растворенного вещества молекулы чистого растворителя будут проникать внутрь мембраны (явление *осмоса*), что приведет к разведению исследуемого раствора.

Растворы макромолекул можно концентрировать путем диализа против растворов высокомолекулярных веществ, таких, например, как полиэтиленгликоль (карбовакс). Диализный мешочек с раствором можно также подвешивать в струе воздуха; в этом случае молекулы растворителя, выходя из мембраны, испаряются, а растворенное вещество, также выходящее из мембраны, скапливается на наружной поверхности мешочка, откуда его периодически удаляют промыванием.

Ультрафильтрация. Разность давлений по обе стороны мембраны создается путем повышения давления со стороны фильтруемого раствора или понижения его в ультрафильтрате. Фирменные приборы для ультрафильтрации состоят из камеры особой конструкции, в которой создается положительное давление, и, как правило, снабжены магнитными мешалками. При ультрафильтрации небольших объемов материала (в клинических лабораториях) разность давлений может создаваться при центрифугировании образца. Ультрафильтрацию можно проводить непрерывно и фильтровать большие объемы.

При обычной ультрафильтрации уменьшение общего объема не приводит к существенному изменению концентрации малых молекул растворенного вещества в удерживаемой жидкости. Повысить скорость обессоливания раствора можно за счет многократного или непрерывного разведения раствора свежим растворителем. Этот метод иногда называют *диафильтрацией*.

Электродиализ. Принципиально этот метод сходен с электрофорезом, с той лишь разницей, что движение макромолекул ограничивается мембраной. Существует целый ряд приборов для электродиализа, различающихся расположением электродов и типом применяемых мембран (гл. 4).

3.11.3. Разделение с помощью полых волокон

Ячейки типа биофайбер и диафайбер состоят из пучка длинных полых волокон с внутренним диаметром порядка 200 мкм. Рабочая поверхность каждого из таких волокон — около 1 см². Волокна с закрепленными в специальном патроне концами погружают в чистый растворитель; диализуемый раствор поступает внутрь волокон. Обессоливание растворов происходит очень быстро — на 99% менее чем за 1 ч. С помощью данного метода можно быстро концентрировать растворы. Для этого исследуемый раствор помещают снаружи волокон, а затем создают разность давлений либо за счет частичного вакуума внутри волокон, либо за счет повышения давления в самом растворе. Скорость концентрирования превышает 100 см³·мин⁻¹. Интересно отметить, что данный метод может с успехом применяться для концентрирования выходящих из колонки элюатов. С помощью полых волокон можно быстро и легко восстанавливать до исходной концентрации растворы веществ, которые подверглись разведению в ходе разделения на колонке. Это особенно важно при работе с такими термолабильными соединениями, как белки и нуклеиновые кислоты.

Полые волокна выпускаются с отверстиями различных диаметров, что позволяет использовать их для фракционирования веществ, например для очистки аминокислот от белков. Они широко применяются для концентрирования плазмы крови и вирусных препаратов, а также при изучении связывания лекарственных веществ с сывороточным альбумином.

3.12. Рекомендуемая литература

- Cuatrecasas P.*, Affinity chromatography of macromolecules. In *Advances in Enzymology*. Ed. by Meister, A., 36, 29. Interscience, New York (1972). (Подробное описание аффинной хроматографии.)
- Friedberg F.*, Affinity chromatography and insoluble enzymes. *Chromatography Reviews*, 14, 121 (1971). (Сведения о несолубилизованных ферментах.)

- James A. T., Morris L. J.*, New Biochemical Separations. Van Nostrand, London (1964). (Обзор различных хроматографических методов и области их применения.)
- Stahl E.*, Thin Layer Chromatography — a Laboratory Handbook. 2nd edn. Allen & Unwin, London, 1969. (Описание систем, применяющихся при разделении биологических молекул методом тонкослойной хроматографии.)

Дополнительная литература

- Хайс И. М., Мацек К.* (ред.), Хроматография на бумаге, пер. с чешск. ИЛ, М., 1962.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

4.1. Введение

Многие важные в биологическом отношении молекулы, такие, как аминокислоты, пептиды, белки и нуклеиновые кислоты, содержат ионизирующиеся группы, поэтому в растворе они могут существовать в заряженной форме, в виде катионов (+) либо анионов (—). Кроме того, молекулы с близкими по величине зарядами, но различающимися молекулярными весами отличаются друг от друга отношением заряда к массе. На всех этих различиях основано разделение ионов при движении их в растворе под действием электрического поля; в этом и состоит принцип электрофореза.

Скорость движения катионов к катоду и анионов к аноду зависит от соотношения между движущей силой электрического поля, действующей на заряженные ионы, и замедляющими движение силами взаимодействия между молекулами и окружающей средой, в основном силами трения и электростатическими силами. Подлежащий электрофоретическому разделению материал растворяют или суспендируют в буфере; чтобы обеспечить проведение электрического тока, этим же буфером насыщают и носитель (разд. 4.3.3). В растворе между электродами ток обусловлен ионами буфера и образца, а в остальной части цепи — электронами. Ток в цепи поддерживается за счет электролиза, происходящего на электродах, каждый из которых погружен в большую буферную камеру. В процессе электролиза на катоде образуются ионы гидроксидов и молекулярный водород, а на аноде — молекулярный кислород и ионы водорода:



Образование на катоде гидроксильных ионов приводит к увеличению диссоциации компонента буферной смеси (НА), представляющего собой слабую кислоту (разд. 1.2.2). Вследствие этого возрастает количество ионов A^- , проводящих ток к аноду. На аноде ионы A^- соединяются с протонами, при этом снова об-

разуется НА, а электроны поступают в электрическую цепь. Каждая буферная камера разделена на два отсека, сообщающихся между собой через небольшие щели или с помощью фитилей из полосок фильтровальной бумаги. В одном отсеке находится электрод, а в другом — носитель (бумага, гель) в контакте с буфером (рис. 4.1). Разделение камеры на отсеки нужно для того, чтобы изменение рН буфера, происходящее у электрода, не сказывалось на буфере, которым насыщен носитель.

Если снять электрическое поле до того, как ионы исследуемой смеси достигнут электродов, компоненты смеси распределятся в соответствии с их электрофоретической подвижностью. Таким образом, электрофорез представляет собой незавершенную форму электролиза.

В свободном растворе сопротивление движению ионов за счет трения между ними и раствором минимально, что обуславливает быстрое продвижение ионов. Поскольку близкие по структуре молекулы обладают близкими зарядами, в электрическом поле они передвигаются совместно в виде полосы с границами раздела, образованными веществами с несколько различающимися электрофоретическими подвижностями. Метод электрофореза, называемый в соответствии с этим *методом подвижной границы*, требует слишком сложной и дорогостоящей аппаратуры, чтобы его можно было использовать в повседневной лабораторной практике; в данном руководстве мы ограничимся рассмотрением электрофокусирования и изотахофореза (разд. 4.4.5 и 4.4.6.)

Применимость электрофореза для разделения заряженных веществ, начиная от маленьких неорганических ионов и кончая большими макромолекулами, в значительной степени зависит от того, проводится ли он *на* или *в* инертном и относительно гомогенном носителе. Иногда намеренно применяют носитель, специфически взаимодействующий с ионами, которые подвергаются разделению, т. е. используют не только различия в отношении заряд/масса, но и в соответствии с конкретными требованиями создают определенные замедляющие силы.

Существует много различных типов носителей: листы хроматографической бумаги или ацетата целлюлозы, тонкие слои окиси кремния или алюминия, крахмальные, агаровые и полиакриламидные гели; всех их насыщают соответствующим буфером. Выбор носителя определяется конкретными условиями анализа. Общая для всех носителей особенность состоит в том, что разделяемые вещества движутся в виде отчетливых зон, которые затем легко обнаружить соответствующим аналитическим методом (табл. 4.1). Этот метод, который получил название *зональный электрофорез*, широко применяется как в препаративных, так и в аналитических целях.

4.2. Факторы, влияющие на подвижность

4.2.1. Образец

Электрофоретическая подвижность заряженных молекул зависит от нескольких факторов.

Заряд. Подвижность возрастает с увеличением суммарного заряда. Величина заряда обычно зависит от pH.

Размеры. Чем крупнее молекулы, тем меньше их подвижность; это связано с возрастанием сил трения и электростатических взаимодействий крупных молекул с окружающей средой по сравнению с молекулами меньших размеров.

Форма. Молекулы одинакового размера, но различной формы, например фибриллярные и глобулярные белки, обладают разной подвижностью; это обусловлено различиями в силе трения и электростатическом взаимодействии.

4.2.2. Электрическое поле

Согласно закону Ома, сила тока I (в амперах), напряжение V (в вольтах) и сопротивление R (в омах) связаны следующим соотношением: $I = V/R$. На разделение ионов в электрическом поле влияют все три фактора.

Сила тока. Поскольку ток в растворе между электродами обусловлен исключительно переносом ионов буфера и образца, скорость их перемещения прямо пропорциональна силе тока. Длина пути, пройденного ионами, будет пропорциональна времени пропускания тока. Следовательно, для максимальной воспроизводимости результатов сила тока в процессе электролиза не должна меняться. Само собой разумеется, что ток должен быть постоянным.

Напряжение. Оно связано с силой тока приведенным выше соотношением; отсюда следует, что скорость миграции пропорциональна падению напряжения в поддерживающей среде, или градиенту напряжения, обычно выражаемому в $V \cdot \text{см}^{-1}$ (приложенное напряжение, деленное на длину слоя носителя). Используются как низкие (100—500 В), так и высокие (500—10 000 В) напряжения с градиентами до 20 и 200 $V \cdot \text{см}^{-1}$ соответственно. По причинам, которые будут разъяснены позднее (разд. 4.1.1), высокие напряжения применяют в основном для разделения низкомолекулярных веществ.

Сопротивление. Скорость миграции обратно пропорциональна сопротивлению, которое в свою очередь зависит от типа и размеров носителя и от ионной силы буфера. Сопротивление возрастает с увеличением длины слоя носителя и уменьшается при увеличении его ширины, а также с возрастанием концентрации буферных ионов.

В ходе электрофореза выделяется тепло, количество которого в единицу времени равно $I^2 R$ Вт, при этом сопротивление уменьшается. Следовательно, при постоянном напряжении такое нагревание приведет к увеличению силы тока и усиленному испарению растворителя. Для обеспечения максимальной воспроизводимости результатов применяют стабилизированные источники питания, которые автоматически поддерживают на постоянном уровне либо напряжение, либо силу тока, несмотря на неизбежные при температурных флуктуациях изменения сопротивления. Испарение сводят до минимума, помещая аппарат под воздухо непроницаемую крышку. Для дополнительного охлаждения при работе с высоким напряжением в аппарат встраивается охлаждающая система.

4.2.3. Буфер

Буфер создает и стабилизирует рН носителя, а также самым различным образом влияет на скорость миграции веществ.

Состав буфера. Наиболее широко применяемые буферы — форматный, ацетатный, цитратный, вероналовый, фосфатный, трис, ЭДТА и пиридиновый. Для разделения углеводов часто используют боратные буферы, преимущество которых заключается в том, что они образуют с углеводами заряженные комплексы.

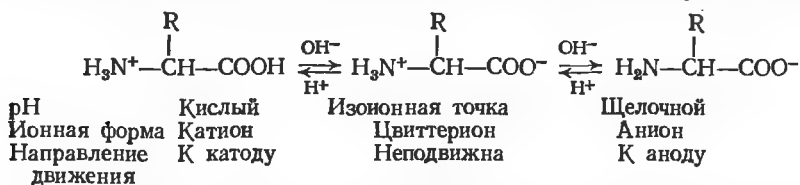
Поскольку буферы служат для образца растворителями, то некоторая диффузия нанесенного образца неизбежна. Это особенно заметно для малых молекул, таких, как аминокислоты и сахара. Диффузию можно свести до минимума, если наносить образцы в виде узких полос и в умеренных количествах, использовать высокое напряжение и как можно быстрее проводить разделение, а по его завершении быстро вынимать и высушивать образцы.

Концентрация буфера. По мере увеличения ионной силы буфера компонент тока, обусловленный переносом ионов буфера, будет возрастать, а доля, приходящаяся на ток за счет ионов образца, уменьшаться. Таким образом, скорость миграции образца уменьшится. При высокой ионной силе буфера суммарный ток увеличивается, а следовательно, возрастает и количество выделяемого тепла.

При низкой ионной силе ток, обусловленный переносом ионов буфера, уменьшается, а доля, приходящаяся на ток за счет ионов образца, возрастает. Таким образом, миграция образца ускоряется. В буфере с низкой ионной силой общая сила тока и выделение тепла уменьшаются, но диффузия возрастает, вследствие чего решающая способность хуже, чем при высокой ионной силе.

Таким образом, при выборе ионной силы буфера приходится идти на компромисс. Применяющиеся обычно ионные силы лежат в интервале концентраций от 0,05 до 0,10 М. Ионная сила равна $\sum cz^2/2$, где c — молярная концентрация иона, а z — его заряд.

pH. Для полностью диссоциирующих веществ, таких, как неорганические соли, pH практически не играет роли, но для органических соединений pH определяет степень ионизации (разд. 1.2.3). С ростом pH ионизация органических кислот возрастает, а оснований, наоборот, уменьшается, и, следовательно, меняется их электрофоретическая подвижность. На такие соединения, как аминокислоты, обладающие как кислотными, так и основными свойствами (амфолиты), pH оказывает двойное действие (разд. 1.2.3).



Таким образом, скорость и направление движения амфолитов зависят от pH, и для их разделения можно использовать буферы с диапазоном pH от 1 до 11.

Буфер, находящийся в обеих камерах, обычно идентичен тому, который используют для насыщения носителя. Однако при гель-электрофорезе, где буфер действует как составная часть носителя, он зачастую отличен от буфера, заполняющего камеры. Значение этого фактора для достижения хорошего разрешения при электрофорезе будет рассмотрено ниже (см. диск-электрофорез, разд. 4.4.3).

4.2.4. Носитель

В качестве носителей используют относительно инертные вещества, однако их состав все же не безразличен для подвижности разных веществ, и выбор соответствующей среды зависит поэтому от природы образца.

Адсорбция. Адсорбция — удерживание молекул образцом носителем, как при адсорбционной хроматографии. Это приводит к размыванию пятен на хроматограмме, в результате чего образец движется не в виде четкой полосы, а имеет вид кометы; разрешающая способность метода при этом уменьшается. Адсорбция приводит также к уменьшению скорости миграции. Наибольшей способностью к адсорбции обладает бумага, однако это нежелательное ее свойство удается устранить, если использовать ацетат целлюлозы.

Электроосмос (электроэндоосмос). Это явление обусловлено возникновением относительного заряда между молекулами воды буферного раствора и поверхностью носителя. Ионизация групп носителя и поверхностная адсорбция ионов буфера обычно приводит к образованию из молекул воды ионов гидроксония (H_3O^+). Так как эти ионы заряжены положительно, они движутся к катоду, захватывая растворенные нейтральные вещества и убыстряя движе-

ние катионов; скорость движения анионов при этом падает. Обычно данными эффектами можно пренебречь, однако, если определять изoeлектрическую точку вещества, нужно вводить соответствующую поправку. Как правило, это делают, следя за движением электрически нейтральных соединений, таких, как мочеви́на или глюкоза.

Электроосмос менее заметен в носителе из ацетата целлюлозы или в полиакриламидном геле, чем в крахмальном геле или на бумаге.

Молекулярное сито. Свойствами молекулярного сита обладает применяемый в гель-электрофорезе полужесткий носитель (гель); такие его свойства способствуют разделению смесей заряженных макромолекул, например белков, которые различаются не только по электрофоретической подвижности, но также формой и размерами. Гели состоят из беспорядочно переплетающихся молекулярных цепей, распределенных по всему объему геля и образующих ситоподобную структуру. В соответствии с конкретными требованиями разделения размер пор гелей можно варьировать в некоторых пределах. Принцип действия молекулярного сита в агаровом, крахмальном и полиакриламидном гелях заключается в том, что крупные молекулы движутся сквозь него тем медленнее, чем меньше размер пор, который определяется числом поперечных сшивок в геле. При использовании гелей типа сефадекса ситуация обратная — в соответствии со спецификой их природы миграция малых молекул тормозится сильнее, чем крупных (разд. 3.7.2).

4.3. Общие методы

4.3.1. Оборудование

Оборудование, необходимое для электрофореза, состоит в основном из двух частей: *источника питания* и собственно *электрофоретического блока*. Описываемое здесь оборудование применяется для работы с низким напряжением. Высоковольтный электрофорез — более специальный метод; он рассмотрен в разд. 4.4.1.

Источник питания генерирует стабилизированный постоянный ток и имеет системы контроля напряжения и силы тока на выходе. Для работы с низким напряжением применяются источники питания с выходным напряжением до 500 В и силой тока до 150 мА, которые обеспечивают либо постоянное напряжение, либо постоянную силу тока.

В электрофоретический блок входят электроды, буферные камеры, опора для носителя и прозрачная изолирующая крышка (рис. 4.1 и 4.2). Можно пользоваться электродами из нержавеющей стали, но поскольку некоторые буферы вызывают коррозию, предпочтительнее платиновые электроды. Обе буферные камеры

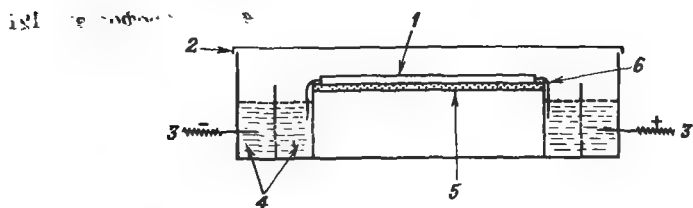


Рис. 4.1. Прибор для горизонтального электрофореза.

1 — носитель; 2 — крышка; 3 — электрод; 4 — отсеки буферной камеры; 5 — изолирующая пластина; 6 — фитиль-мостик.

обычно разделены на два отсека: электродное отделение и отделение для фитиля-мостика. Электрический контакт между буферными растворами в обоих отделениях осуществляется за счет маленьких отверстий или щелей в перегородке между отделениями или с помощью пористых фитилей. Контакт между носителем, всегда насыщенным буфером до начала электрофореза, и буфером, находящимся в камерах, обычно поддерживается с помощью фитилей-мостиков из нескольких слоев фильтровальной бумаги или марли. Коммерческие фитили, покрытые оболочкой, можно использовать неоднократно. При низковольтном электрофорезе на бумаге можно обойтись без мостиков — контакт создается за счет непосредственного погружения бумаги в буферный раствор.

Насыщенный буфером носитель, на который нанесен образец, обычно располагают горизонтально (*горизонтальный электрофорез*) на плоской поверхности изолирующего материала, например плексигласа (рис. 4.1). При горизонтальном электрофорезе разделение можно проводить на бумаге, ацетате целлюлозы, в гелевых пластинах и в тонком слое, хотя работа с тонкими слоями при более высоких напряжениях требует применения металлических охлаждающих пластин, как при высоковольтном электрофорезе (разд. 4.4.1). Иногда гели и тонкие слои прикрывают пластиной из изолирующего материала, чтобы предотвратить испарение. Для работы с низким напряжением имеется простое оборудование для *вертикального электрофореза* (рис. 4.2); можно использовать пластины крахмального геля, помещая их вертикально в специальные камеры.

В полиакриламидном геле образцы разделяют на горизонтальных пластинах только при препаративном электрофорезе, а для аналитических исследований применяют цилиндрические столбики геля, поддерживаемые в вертикальном положении внутри калиброванных стеклянных трубок в специальных приборах (рис. 4.7).

Во время работы электрофоретический блок нужно закрывать крышкой, чтобы свести до минимума испарение буферного раствора и обеспечить электрическую изоляцию.

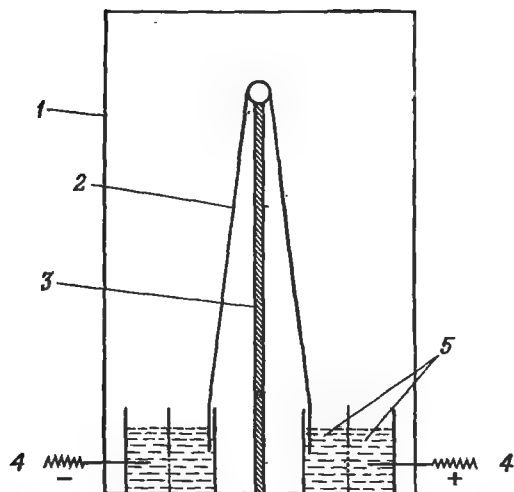


Рис. 4.2. Прибор для вертикального электрофореза.

1 — крышка; 2 — носитель (бумага); 3 — опора; 4 — электрод; 5 — отсеки буферной камеры.

4.3.2. Приготовление носителей и их свойства

Бумага. Специальной электрофоретической бумаги не существует — для электрофореза подходит обычная хроматографическая бумага. Бумагу очень удобно использовать в качестве носителя, так как она не требует никакой подготовки — ее просто нужно разрезать на куски требуемого размера. Химический состав и свойства бумаги были описаны ранее (разд. 3.3.1). При электрофорезе с использованием бумаги всегда наблюдается некоторая адсорбция; ее можно уменьшить, используя буфер с более высоким значением рН, чем изоэлектрическая точка образца, однако электроосмос вследствие особенностей химического состава бумаги всегда будет проявляться в той или иной степени.

Бумажный электрофорез — самый простой и, возможно, наиболее широко применяемый из электрофоретических методов. Он годится для разделения целого ряда заряженных веществ, однако в настоящее время его в ряде случаев вытеснил электрофорез на ацетате целлюлозы и в гелях, обладающий более высоким разрешением. При использовании всех этих носителей наблюдается значительная диффузия малых молекул; наилучших результатов удается достичь при работе с высоким напряжением (разд. 4.4.1).

Ацетат целлюлозы. Высокоочищенный ацетат целлюлозы имеется в продаже в виде тонких полос стандартного размера. Вследствие его очень незначительной адсорбирующей способности можно даже для макромолекул получить высокое разрешение с небольшим

количеством вещества. Ацетат целлюлозы менее гидрофилен, чем бумага, поэтому он удерживает меньшее количество буферного раствора. Следовательно, большая часть тока обусловлена ионами образца, что обеспечивает очень быстрое их разделение. Правда, это сопровождается выделением большого количества тепла, и поэтому при работе с высоким напряжением нужно принимать меры предосторожности, чтобы полосы не высохли вследствие испарения.

Электрофорез на ацетате целлюлозы широко применяется в клинических исследованиях, а в сочетании с иммунодиффузией может использоваться и для иммуноэлектрофореза (разд. 4.4.4). Отсутствие адсорбции на ацетате целлюлозы и обусловленная этим высокая разрешающая способность позволяет при использовании радиоизотопов получать четко разграниченные радиоактивные области.

Тонкие слои. Тонкие слои окиси кремния, кизельгура, окиси алюминия или целлюлозы наносят на стеклянные пластинки так же, как и при тонкослойной хроматографии (разд. 3.2.3). Пластины помещают горизонтально в аппарат для электрофореза, и тонкому слою дают возможность насытиться буфером за счет диффузии раствора из буферной камеры через соединяющие фитили. Тонкослойный электрофорез (ТСЭ), подобно тонкослойной хроматографии (разд. 3.2.3), проходит быстро и дает хорошее разрешение при высокой чувствительности.

В сочетании с хроматографией ТСЭ очень удобен для двухмерных разделений, когда после электрофореза в перпендикулярном ему направлении проводят хроматографирование. Такой метод, известный под названием «метода отпечатков пальцев», дает неоценимую возможность охарактеризовать гидролизаты белков и нуклеиновых кислот. Тонкослойные носители, подобные тем, которые описаны выше, используются и для разделения при высоких напряжениях.

Гели. Агаровые, крахмальные, полиакриламидные и другие гели следует готовить непосредственно перед использованием, а это зачастую процесс, требующий времени. Свойства гелей таковы, что и адсорбция, и электроосмос, и расширение зон в результате диффузии очень незначительны. Гель-электрофорез применяется и для препаративных целей, но гораздо более широко используется как аналитический метод и особенно ценен для разделения смесей веществ, имеющих одинаковые заряды, но слегка различающиеся массы.

Крахмальные гели. Крахмальные гели готовят путем нагревания и охлаждения смеси частично гидролизованного крахмала с соответствующим буфером. Это приводит к переплетанию разветвленных цепей молекул и образованию полужесткой структуры. Буфер для крахмальных гелей, как правило, подбирают эмпирически, и для этой цели с успехом применяют целый ряд разных буферов. «Слабые», высокопористые гели можно приготовить, добавляя к буферному раствору менее 2% (весовые проценты) крахмала, а

«сильные», низкопористые — от 8 до 15%. Точный размер пор образующихся при этом крахмальных гелей определить, однако, не удается.

Гели обычно наносят на прямоугольные пластины из плексигласа, размеры которых зависят от того, в каком положении — горизонтальном или вертикальном — будут проводить разделение. Типичные размеры пластин для горизонтального электрофореза — $20 \times 10 \times 0,6$ см, а для вертикального — $25 \times 12,5 \times 0,6$ см. Перед использованием пластины с гелями выдерживают при $0-4^\circ \text{C}$.

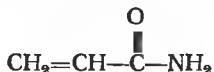
Наибольшее применение крахмальные гели для электрофореза нашли при разделении сложных смесей структурных и физиологических активных белков.

Агар — это смесь двух галактозных полимеров, агарозы и агаропектина. Их концентрация в геле равна всего 1%, т. е. агар содержит большое количество воды, вследствие чего ионы в процессе электрофореза движутся очень быстро. Благодаря этому свойству агар очень удобен для разделения и обнаружения антигенов методом иммуноэлектрофореза (разд. 4.4.4).

Полиакриламидный гель. Полиакриламидные гели обладают рядом свойств, благодаря которым они особенно успешно применяются для разделения макромолекул:

- а) размер пор у них можно варьировать в широких пределах;
- б) их можно формировать в калиброванных трубках и, следовательно, получать воспроизводимые результаты;
- в) их можно применять с самыми разными буферами;
- г) разделение проходит очень быстро;
- д) адсорбция и электроосмос низки;
- е) они не поглощают ультрафиолетовый свет при 270 нм, и, следовательно, местоположение белков после разделения можно определить по поглощению при этой длине волны;
- ж) после разделения макромолекулы можно окрашивать и определять количество вещества с помощью денситометра.

Полиакриламидные гели получают при сополимеризации акриламида



и N, N'-метиленадиакриламида $[\text{CH}_2(\text{NHCOCH}=\text{CH}_2)_2]$ в присутствии соответствующего свободнорадикального катализатора. Этот катализатор обычно представляет собой смесь 0,1—0,3% (весовые проценты) персульфата аммония либо с 0,1—0,3% β-диметиламинопропионитрилом (ДМАП), либо с N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТМЭД). Пористость геля определяется соотношением между акриламидом и соединением, образующим поперечные связи. На рис. 4.3 показана сетчатая структура геля.

Мономеры и катализатор сначала смешивают в буфере, а затем заливают в цилиндрические трубки из стекла или плексигласа диаметром 5—6 мм и длиной 6—7 см. Трубки закрывают снизу резиновыми колпачками и ставят вертикально в штатив. Процесс полимеризации ингибируется кислородом, и, чтобы избежать этого, на поверхность геля осторожно накладывают дистиллированную воду на высоту нескольких миллиметров. Это наложение обеспечивает

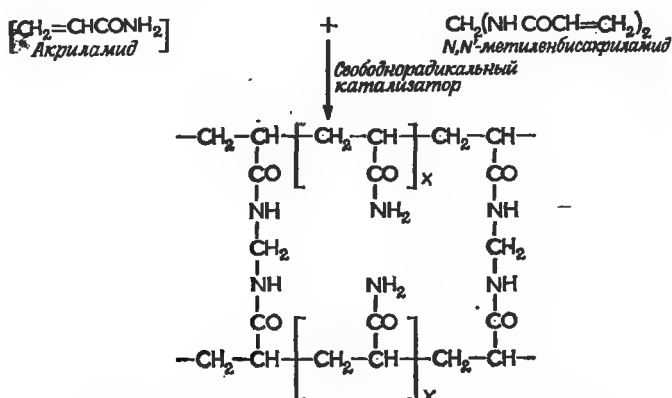


Рис. 4.3. Образование полнакриламидного геля.

также образование плоской поверхности у верхнего конца столбика геля. Наслаивание осуществляют либо с помощью шприца для подкожных инъекций, либо через капилляр с продетым в него хлопчатобумажным волокном. Вода стекает из капилляра по волокну и равномерно растекается по поверхности плотного полиакриламидного раствора.

Можно приготовить гели с общим содержанием акриламида от 3 до 30% (весовые проценты), что соответствует размерам пор от 0,2 до 0,5 мкм. Чем меньше процентное содержание акриламида, тем крупнее поры и тем меньшее сопротивление оказывает гель прохождению больших молекул. Для разделения веществ с мол. весом около 10^4 дальтон применяется 30%-ный гель, а для веществ с мол. весом более 10^6 дальтон — гель с 3%-ным содержанием акриламида.

4.3.3. Ход работы

Насыщение носителя. Если носитель не является гелем, для обеспечения электропроводности его необходимо насытить буфером до начала электрофореза. Насыщение лучше производить до нанесения образца, иначе это с самого начала приведет к его размыва-

нию. Хроматографическую бумагу погружают в буфер и удаляют избыток влаги промоканием. Полосы бумаги из ацетата целлюлозы пропитывают буфером, предоставляя им возможность плавать по поверхности буфера в плоском сосуде (при быстром погружении бумага захватывает пузырьки воздуха, которые потом трудно удалить). Тонкослойные среды лучше всего насыщать, используя их капиллярные свойства, как описано в разд. 4.3.2.

Нанесение образца. Раствор с образцом обычно наносят микропипеткой в виде маленького пятна или узкой полосы. Если отдельные компоненты смеси имеют противоположные заряды, они в ходе разделения будут двигаться к разным электродам, и образец в этом случае нужно наносить примерно посередине. Если же все компоненты будут двигаться в одном направлении, т. е. если все они заряжены либо положительно, либо отрицательно, образец нужно наносить как можно дальше от соответствующего электрода, у противоположного конца носителя, чтобы разделяемые компоненты проходили возможно большее расстояние. При горизонтальном электрофорезе пропитанные образцом полосы фильтровальной бумаги вводят в щель или ямку, вырезанные на поверхности геля. При вертикальном электрофорезе образец в 10%-ном растворе сахарозы наслаивают на поверхность вертикального столбика геля. Изредка образец включают в широкопористый гель, называемый *гелем образца*.

К образцам, представляющим собой белковые смеси, для улучшения их солиubilизации добавляют мочевины или додецилсульфат натрия. В состав смесей довольно часто включают также краситель, например бромфеноловый синий. Наблюдая за его движением, можно получить некоторое представление о поведении системы в ходе разделения.

Разделение. После нанесения образца включают источник питания, поддерживая соответствующее напряжение в течение всего процесса разделения. Даже при наличии стабилизированных источников питания необходимо постоянно следить за работой прибора, так как если носитель подготовлен недостаточно тщательно, возможен перегрев, а в случае применения бумаги — даже ее обугливание. Низковольтный электрофорез обычно завершается в течение 1—2 ч, хотя для разделения белков на бумаге требуется немного больше времени. Разделение при высоком напряжении, как правило, заканчивается в течение 1 ч. По окончании электрофореза сначала выключают источник питания, а затем извлекают носитель.

Извлечение носителя. Бумагу, полоски ацетата целлюлозы и тонкослойные пластины извлекают и сушат прямо на воздухе, обычно в печи при 110°C. Для извлечения цилиндрических полиакриламидных гелей столбик геля обводят струей воды под давлением, применяя для этого шприц для подкожных инъекций. Благодаря этому гель отстает от стенок трубки, и его выталкивают. Для умень-

шения диффузии веществ, подвергшихся разделению, гели при необходимости помещают в фиксирующий раствор, например 7%-ный раствор уксусной кислоты.

Окрашивание и извлечение веществ. Большинство биологических соединений не окрашено, и для определения их местоположения по завершении разделения необходимо каким-то образом сделать их «видимыми». Для этого применяются методы, упомянутые при рассмотрении тонкослойной и бумажной хроматографии (разд. 3.2.3 и 3.3.1).

Таблица 4.1

**Методы окрашивания соединений
после электрофоретического разделения**

Вещество	Реактив	Примечание
Белки	Нигрозин в уксусной или трихлоруксусной кислоте ¹	Очень чувствительный
	Бромфеноловый синий — $ZnSO_4$ — уксусная кислота ²	Количественный
	Лиссамина зеленый в уксусной кислоте ³	»
Гликопротеиды	Окисление иодной кислотой с последующей обработкой реактивом Шиффа ⁴	»
Липопротеиды	Судан черный в 60%-ном этаноле ⁵	
Пептиды	Хлорирование ClO_2 или $NaOCl$ с последующей обработкой раствором крахмала с KI или бензидинуксусной кислотой ⁶	Реагирует со всеми соединениями, содержащими NH_2 -группы
Нуклеиновые кислоты	Метиловый зеленый — пиронин ⁷	При связывании с РНК красный, с ДНК — голубой
Полисахариды	Иод ⁸	
Кислые мукополисахариды	Толуидин синий в смеси метанол — вода ⁹	

¹ Ortega M., Nature, Lond., 179, 1086 (1957).

² Jencks W. P., Jetton M. R., Durrum E. L., Biochem. J., 60, 205 (1955).

³ Discombe G., Jones R. F., Winstanley D. P., J. clin. Path., 7, 106 (1954).

⁴ Kohn E., Gronwall A., Scand. J. clin. Lab. Invest., 4, 244 (1952).

⁵ Swahn B., Scand. J. clin. Lab. Invest., 5, Suppl. 9, (1953).

⁶ Rydon H. N., Smith R. W., Nature Lond., 169, 922 (1952).

⁷ Delmet M., Biochem. Z., 326, 358 (1954).

⁸ Foster A. B., Newton-Hearn P. A., Stacey M., J. Chem. Soc. Part 1, 30 (1956).

⁹ Reinits K. G., Biochem. J., 63, 79 (1953).

Наиболее широко практикуемый метод определения местоположения веществ после электрофореза на бумаге, ацетате целлюлозы и в геле — это обработка среды красителем, который избирательно

окрашивает компоненты образца. Примеры подобных методов окрашивания даны в табл. 4.1. Если краситель количественно взаимодействует с компонентами смеси, то можно определить количество окрашенного вещества одним из двух способов. Во-первых, можно вырезать соответствующий участок носителя и экстрагировать из него соединение подходящим растворителем, а затем каким-либо методом, например спектрофотометрически, определить его количество. Если носителем является ацетат целлюлозы, его растворяют в органическом растворителе, например ацетоне; окрашенное вещество оказывается при этом в растворе. Во-вторых, носитель можно сканировать с помощью денситометра. Этот прибор измеряет количество света, проходящего через узкую полосу носителя при перемещении его перпендикулярно световому лучу. Количество света, прошедшего через среду и попавшего на детектор денситометра, связано обратной зависимостью с количеством окрашенного вещества. На приборе записывается серия пиков, соответствующих положению окрашенных зон. Калибровку прибора проводят, снимая показания денситометра для известных количеств данного компонента, нанесенного на носитель и обработанного красителем. Совершенно очевидно, что нужно стремиться к минимальному фоновому окрашиванию носителя. В этом отношении полосы из ацетата целлюлозы имеют преимущество перед бумажными: ацетат целлюлозы становится прозрачным, если погрузить его в жидкий парафин. Окрашенные зоны при этом становятся более отчетливыми. Избыток красителя с полос ацетата целлюлозы и из гелей удаляют многократным погружением их в какой-либо растворитель, например разведенную уксусную кислоту.

Локализацию белков, обладающих ферментативной активностью, можно определить косвенным путем. Для этого гель помещают в раствор субстрата данного фермента, и, если продукт реакции окрашен, сразу выявляется его местоположение, а следовательно, и местоположение фермента.

Местоположение радиоактивных веществ можно обнаружить методом авторадииографии или с помощью прибора для сканирования радиохроматограмм. Носитель можно также разрезать на маленькие кусочки, поместить их в соответствующий сцинтиллятор и определить радиоактивность с помощью сцинтилляционного счетчика.

4.4. Специальные электрофоретические методы

4.4.1. Высоковольтный электрофорез

При разделении низкомолекулярных веществ с помощью низковольтного электрофореза на бумаге наблюдается значительная диффузия. Это нежелательное явление можно исключить, если приме-

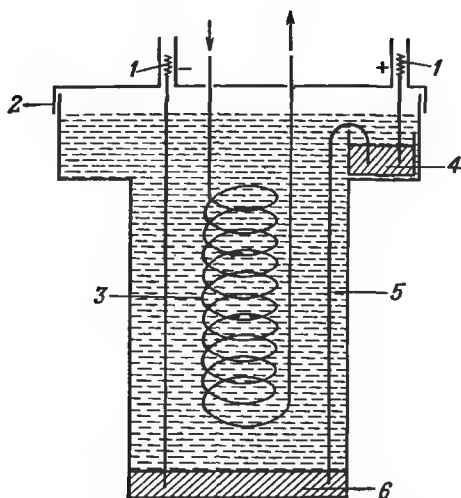


Рис. 4.4. Система полного погружения при высоковольтном электрофорезе. 1 — электрод; 2 — изолированная крышка; 3 — змеевик; 4 — буфер; 5 — лист бумаги, 6 — буфер.

нять значительно более высокие напряжения; при этом улучшается разрешение, а разделение происходит очень быстро, за 10—60 мин. Для этой цели используют источники питания, обеспечивающие напряжение до 10 000 В, силу тока до 500 мА и создающие градиент потенциала до $200 \cdot \text{В} \cdot \text{см}^{-1}$.

При высоковольтном электрофорезе выделяется такое большое количество тепла, что требуется эффективная система охлаждения. Охлаждение можно осуществлять двумя способами — «полным погружением» и с помощью охлаждающих пластин.

При «полном погружении» (рис. 4.4) насыщенную буфером бумагу с нанесенным образцом погружают в большой объем охлаждающей жидкости, которая действует как жидкий теплообменник, отводя от бумаги тепло. Охлаждающая жидкость должна быть электрически инертной и не смешиваться ни с буфером, ни с образцами. Для этих целей широко применяются органические растворители, например толуол или варсол (уайт-спирт). Обычно в охлаждающую жидкость погружают змеевик, по которому циркулирует вода, что обеспечивает дополнительное охлаждение. Метод «полного погружения» достаточно эффективен и технически легко осуществим, однако охлаждающие жидкости, как правило, токсичны и легко воспламеняемы.

Система охлаждающих пластин безопаснее и более эффективна (рис. 4.5). Две пластины (как правило, алюминиевые) плотно, под

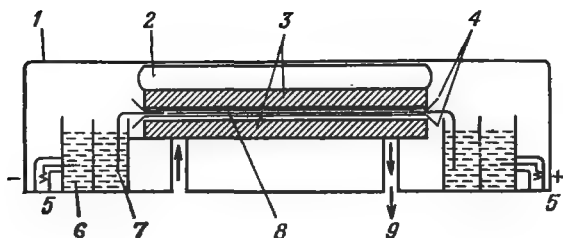


Рис. 4.5. Система с охлаждающими пластинами при высоковольтном электрофорезе.

1 — изолированная крышка; 2 — прижимающая прокладка; 3 — охлаждающие пластины; 4 — полилен; 5 — электрод; 6 — буфер; 7 — фитиль-мостик; 8 — лист бумаги; 9 — охлаждающая жидкость (вода).

давлением прижимаются надувной прокладкой к изолированному от них полиленовому носителю. Размеры пластин доходят до 50×50 см, поэтому разделение можно проводить на листах бумаги большого формата (обычно ватман 3 ММ). В охлаждающих пластинах имеются каналы для циркуляции воды. При использовании больших пластин расход воды должен составлять от 10 до $15 \text{ дм}^3 \cdot \text{мин}^{-1}$. В жарких странах воду необходимо предварительно охлаждать. Если вода очень жесткая, рекомендуется добавлять в нее умягчитель, чтобы предотвратить образование осадка в каналах пластин. Нужно следить за тем, чтобы на пластинах не возникало температурных градиентов, так как различие в 1°C вызывает изменение скорости миграции на 3%, а это сказывается на воспроизводимости результатов. Исключительно важно, чтобы все оборудование было полностью электрически изолировано, поскольку применяемые напряжения смертельны. Необходимо строго соблюдать обычные меры предосторожности, несмотря на то что фирменные приборы, как правило, снабжены для предотвращения несчастных случаев рядом предохранительных отключающих устройств.

При исследовании белковых гидролизатов часто после высоковольтного электрофореза проводят хроматографию в перпендикулярном направлении. В этом случае, как и при двухмерном тонкослойном электрофорезе (разд. 4.3.2), получаются характерные для различных белков «отпечатки пальцев».

4.4.2. Непрерывный (проточный) электрофорез

Проточный электрофорез — это разновидность низковольтного электрофореза на бумаге. Образец, растворенный или суспендированный в буфере, непрерывно наносят в верхней части вертикально расположенного листа бумаги. Образец увлекается вниз буфером, стекающим под действием силы тяжести, одновременно с этим

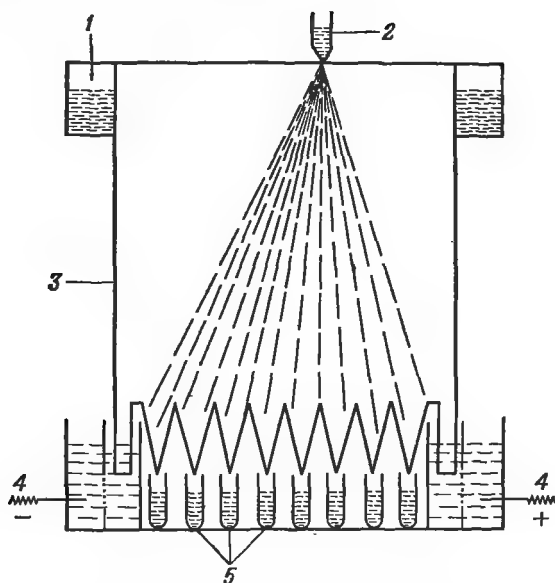


Рис. 4.6. Прибор для непрерывного (проточного) электрофореза.

1 — сосуд с буферным раствором; 2 — устройство для нанесения образца; 3 — лист бумаги; 4 — электрод; 5 — пробирки коллектора.

заряженные компоненты образца под влиянием электрического поля перемещаются в горизонтальном направлении (рис. 4.6). Аппарат помещают в камеру из плексигласа. Падение напряжения на бумаге составляет до 500 В, скорость нанесения образца равна приблизительно $0,2 \text{ см}^3 \cdot \text{ч}^{-1}$.

Стационарность потока буфера обеспечивается тем, что буферный раствор в сосуде поддерживается на постоянном уровне. Разделившиеся вещества собирают в пробирки, расположенные под нижним зубчатым краем листа бумаги. Разделение продолжается до 2 сут. Оптимального разделения в каждом частном случае добиваются путем эмпирического подбора места нанесения образца, скорости движения буфера и образца, а также применяемого напряжения.

Для получения данным методом хороших результатов требуется значительный навык и экспериментальное искусство, и поэтому он применяется в основном для специальных исследований. Его можно использовать не только для разделения заряженных молекул, но и для фракционирования клеток различных типов, клеточных оргanelл и фрагментов мембран.

4.4.3. Диск-электрофорез

Прибор для диск-электрофореза показан на рис. 4.7. Он состоит из двух сосудов с буфером — верхнего и нижнего, соединенных между собой рядом вертикальных цилиндрических стеклянных трубок (рабочие трубки), содержащих гель (рабочий гель и гель-прокладку). В нижнем сосуде находится анод, а в верхнем — катод. Образцы наносят на поверхность столбиков геля при заполненном буфером нижнем сосуде, затем буфером заполняют и верхний сосуд, ставят на место крышку и включают ток. Буферные растворы подбирают таким образом, чтобы разделяемые вещества были в них заряжены отрицательно. По мере их движения через гель вниз, к аноду, происходит разделение, обусловленное различиями отношений заряда к массе. Диск-электрофорез называют еще «прерывистым» электрофорезом (в отличие от непрерывного, проточного). Это название отражает особенность метода, заключающуюся в использовании *неоднородной* («прерывистой») среды (гелей) и буферов разного состава и с разными значениями pH. Верхняя треть столбика геля состоит из крупнопористого геля-прокладки, или *концентрирующего* геля, а нижняя — из *рабочего*, или *разделяющего*, геля с более мелкими порами. Роль концентрирующего геля заключается в концентрировании образца по мере его прохождения через этот гель; в результате образец подходит к рабочему гелю в виде чрезвычайно узкой полосы. Рабочий гель действует по принципу молекулярного сита (разд. 4.4.2). pH буфера в верхнем сосуде меньше, чем буфера, насыщающего гель, и благодаря этому различию образец по мере прохождения через гель-прокладку концентрируется. Наглядно принцип, лежащий в основе диск-электрофореза, проиллюстрирован на примере разделения белков на рис. 4.8.

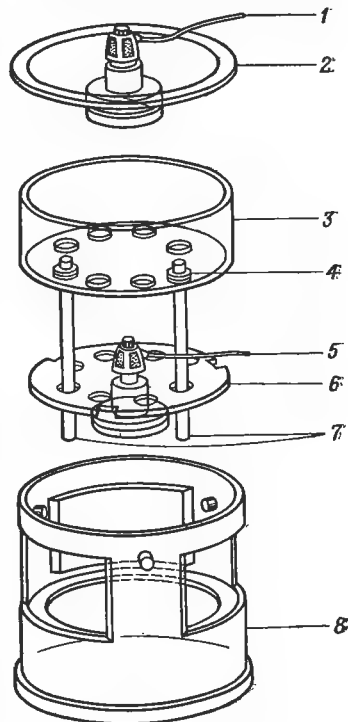


Рис. 4.7. Прибор для Диск-электрофореза.

1 — электрический провод (к катоду); 2 — крышка с электродом в сборе; 3 — верхний сосуд для буфера; 4 — резиновые вкладыши; 5 — электрический провод (к аноду); 6 — блок с нижним электродом; 7 — рабочие трубки; 8 — нижний сосуд с буфером.

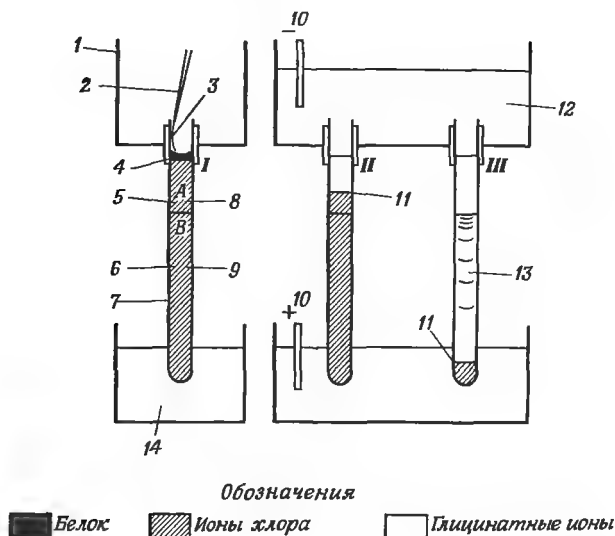


Рис. 4.8. Разделение с помощью диск-электрофореза (с любезного разрешения компании Shandon Southern Instruments Ltd.).

1 — верхний сосуд; 2 — стеклянный капилляр; 3 — хлопчатобумажное волокно; 4 — образец, pH 6,7; 5 — трис-HCl, pH 6,7; 6 — трис-HCl, pH 8,9; 7 — рабочая трубка; 8 — гель-прокладка, 5%-ный полиакриламид; 9 — рабочий гель, 7,5%-ный полиакриламид; 10 — электрод; 11 — градиент напряжения; 12 — трис-глицин, pH 8,3; 13 — трис-глицин, pH 9,5; 14 — нижний сосуд; I — нанесение образца; II и III — начальная и конечная стадии электрофореза.

Верхний гель имеет высокую пористость, и в связи с этим крупные молекулы проходят через него практически свободно. Следовательно, в этой части геля подвижность белков приближается к таковой для свободного раствора.

В состав буфера как в верхнем сосуде, так и в концентрирующем геле входит слабое аминное основание — трис, но если в верхнем сосуде дополнением к трису служит слабая кислота глицин и образуется трис-глициновая буферная система, то концентрирующий гель содержит сильную кислоту — HCl, что дает буферную систему трис-HCl. Таким образом, pH в концентрирующем геле примерно на 2 единицы ниже, чем в верхнем сосуде. Глицин в верхнем сосуде при pH 8,3 на 95% находится в виде цвиттериона ($\text{CH}_2(\text{N}^+\text{H}_3)\text{COO}^-$), и только 5% приходится на долю глицинатного аниона ($\text{CH}_2(\text{NH}_2)\text{COO}^-$) (см. уравнение Гендерсона—Хассельбальха, разд. 1.2.3).

Белок наносят при pH концентрирующего геля, и он имеет очень небольшой суммарный отрицательный заряд. В электрическом поле глицинатные ионы, движущиеся из верхнего резервуара в концентрирующий гель, имеют гораздо меньшую подвижность, чем

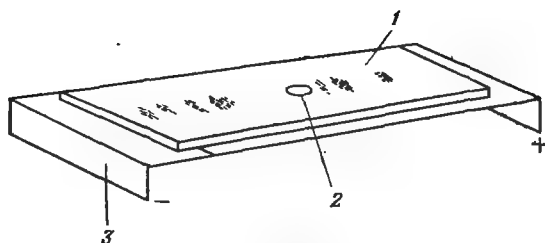
ионы хлора и, следовательно, «тянутся» позади них. В среде верхнего геля, имеющей более низкое значение рН, подвижность глицинатных ионов становится еще меньше, так как в результате дополнительного протонирования увеличивается количество цвиттерионов. Ионы хлора, напротив, продвигаются очень быстро, и между этими двумя разновидностями ионов возникает граница раздела. Так как и ионы хлора, и глицинатные ионы представляют собой часть одной и той же электрической системы, то в области локализации менее подвижных глицинатных ионов напряжение увеличивается, а в области более подвижных ионов хлора — уменьшается. Следовательно, замыкающие ионы будут стремиться догнать *ведущие*, а белковые анионы, промежуточные по подвижности, будут располагаться между первыми и вторыми ионами. В итоге происходит концентрирование белковых анионов позади ведущих ионов. Образуется чрезвычайно узкая белковая полоса, которая подходит к рабочему гелю вслед за ионами хлора.

Когда замыкающие глицинатные ионы доходят до рабочего геля, их число и подвижность увеличиваются, поскольку значение рН 8,9 приближается к pK_a глицина. Теперь подвижность глицинатных ионов становится выше, чем у белковых анионов. Глицинатные ионы «подтягиваются», при этом образуется более резкая граница между ними и ионами хлора. С белковыми анионами такого не происходит, поскольку молекулярное сито при переходе от верхнего геля к рабочему становится более мелким. Как только последний ион хлора уходит из рабочего геля, рН повышается, потому что ионы хлора заменяются более основными глицинатными, и вместо исходной системы трис-НСI образуется трис-глициновый буфер. Вследствие этого возрастает отрицательный заряд белковых анионов, и их движение в однородном электрическом поле происходит в соответствии с величинами отношения заряд/масса. Электрофорез обычно завершается в пределах 1 ч при постоянной силе тока 10 мА на одну рабочую трубочку.

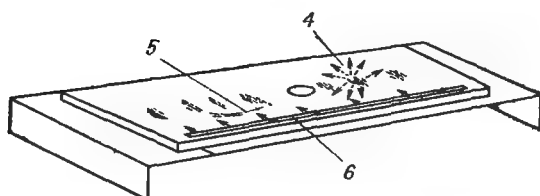
4.4.4. Иммуоэлектрофорез

Этот метод, сочетающий электрофорез с иммунодиффузией, дает возможность различить сходные по электрофоретической подвижности вещества с помощью специфической реакции преципитации между антигеном и соответствующим антителом. Метод особенно ценен для обнаружения антигенов в сложных физиологических смесях, например антигенов иммуноглобулинов. Принцип, лежащий в основе иммуоэлектрофореза, наглядно представлен на рис. 4.9.

Первоначально смесь антигенов разделяют с помощью электрофореза на тонкой агаровой пластинке. Затем в желобок, вырезанный в агаре, вносят смесь антител. Смесь диффундирует через



I. Разделение антигенов с помощью электрофореза в течение 90 мин при 10 В·см^{-1}



II. Диффузия и преципитация в течение 16-24 ч

Рис. 4.9. Разделение с помощью иммуноэлектрофореза.

1 — 2%-ый (весовые проценты) агар на стеклянной пластинке; 2 — смесь антигенов; 3 — мостик-фильтр из фильтровальной бумаги, погружаемый в электродную камеру; 4 — антиген, диффундирующий радиально от места нанесения; 5 — дуга преципитации вдоль линии максимальной концентрации; 6 — желобок, в который помещают смесь антител, диффундирующих перпендикулярно направлению, в котором производился электрофорез.

пластинку латерально, и в то же самое время происходит радиальная диффузия антигенных компонентов от мест их локализации в агаре. При встрече антигена с соответствующим антителом происходит преципитация в форме дуги. Количество образовавшихся дуг соответствует числу антигенов. Предпочтительнее проводить иммуноэлектрофорез на агаре, однако можно использовать также ацетат целлюлозы, крахмальный и полиакриламидный гели.

4.4.5. Изоэлектрическое фокусирование

В основе этого метода лежит фронтальный, а не зональный электрофорез (разд. 4.1). Амфотерные вещества, такие, как аминокислоты и пептиды, разделяют на специально предназначенной для этого вертикальной колонке одновременно в градиенте как рН, так и напряжения. Каждое вещество движется к той части колонки, где значение рН соответствует его изоэлектрической точке, и там останавливается (фокусируется).

Метод состоит в следующем. Вертикальную стеклянную колонку заполняют смесью имеющихся в продаже синтетических низкомолекулярных амфолитов-носителей, индивидуальные изоэлектрические точки которых имеют значения, перекрывающие предварительно выбранную область рН. Амфолиты обычно суспендируют в растворе сахарозы, чтобы среда была плотной и в ней отсутствовали конвекционные потоки. Верхний конец колонки (анод) соединен с сосудом, содержащим сильноокислый раствор (например, фосфорную кислоту), а нижний (катод) — с сосудом, содержащим сильнощелочной раствор (например, этаноламин). При открытии клапанов в сосудах эти растворы начинают диффундировать в колонку каждый со своего конца, и через некоторое время в колонке устанавливается градиент рН с крайними значениями, соответствующими рН кислого и щелочного растворов. После этого клапаны закрывают и включают ток. Амфолиты в растворе мигрируют до тех пор, пока не достигнут области рН, при которой их суммарный заряд равен нулю. Здесь они прекращают движение, стабилизируя тем самым исходный градиент рН. Затем, открыв кран, вводят в верхнюю часть колонки образец. Разделение продолжается от 1 до 3 сут; за это время компоненты смеси распределяются по зонам со значениями рН, соответствующими их изоэлектрическим точкам. По завершении разделения выключают ток и фракции, поступающие через кран в нижней части колонки, собирают в пробирки коллектора для последующего анализа.

Изоэлектрическое фокусирование оказалось весьма полезным методом для разделения, очистки и идентификации белков за один прием. Очень высокая разрешающая способность метода делает его особенно ценным для идентификации изоферментов: для разделения достаточно различий в изоэлектрических точках всего в 0,02 единицы рН.

Гель-электрофокусирование является модификацией изоэлектрического фокусирования и применяется преимущественно для микроанализа белков. Сахарозную среду заменяют полиакриламидным гелем, а разделение занимает всего 1—3 ч.

4.4.6. Изотахофорез

Этот метод также основывается на принципе фронтального электрофореза (метод подвижной границы, разд. 4.1). В зависимости от применяемого оборудования разделение проводят либо в горизонтальном, либо в вертикальном направлении. Раствор, в котором происходит разделение, обычно представляет собой водную среду, содержащую сахарозу для обеспечения более высокой плотности. К образцу добавляют по одному виду ионов с высокой и низкой электрофоретической подвижностью (например, ионы хлора и гли-

цината соответственно); оба иона имеют тот же заряд, что и разделяемые ионы образца. Все они будут иметь противоионы.

После нанесения образца включают ток; ионы с самой высокой подвижностью движутся к соответствующему электроду первыми. На некотором расстоянии от них следуют самые малоподвижные ионы, а ионы образца, обладающие промежуточной подвижностью, располагаются между ними соответственно их относительным подвижностям. Если подвижности ионов образца очень близки, разрешение можно улучшить путем внесения в исходный образец синтетических амфолитов, называемых ионами-прокладками. Эти ионы по сравнению с ионами образца обладают промежуточной подвижностью и, располагаясь между ними, способствуют разделению последних. Ионы-прокладки сходны с теми, которые применяются при электрофокусировании. Они создают градиент pH между ведущими и замыкающими ионами, способствуя тем самым дополнительному разделению ионов образца по принципу электрофокусирования. Изотахорефрез обладает очень высокой разрешающей способностью и применяется как для аналитического, так и для препаративного разделения самых разнообразных веществ.

4.5. Применение электрофореза

Электрофорез используется для разделения молекул, несущих суммарный заряд. Низковольтный электрофорез на бумаге нашел широкое применение для разделения аминокислот, пептидов, белков, нуклеотидов, нуклеиновых кислот и заряженных производных углеводов. Однако при низковольтном электрофорезе на бумаге имеет место значительная диффузия малых молекул, поэтому для их разделения применяют, как правило, высоковольтный электрофорез, при котором время разделения сводится до минимума и вследствие этого уменьшается диффузия. Вместо бумаги в качестве носителя зачастую используют ацетат целлюлозы, высокая чистота которого обуславливает уменьшение адсорбции образца, а следовательно, и лучшее разделение его компонентов. Одним из преимуществ ацетата целлюлозы является также его слабое фоновое окрашивание, что облегчает выявление соединений после разделения. Электрофорез на ацетате целлюлозы нашел широкое применение в клинике для разделения белков сыворотки крови (включая гликопротеиды и липопротеиды) и гемоглобинов; он применяется также при иммуноэлектрофорезе. Высоковольтный электрофорез, как бумажный, так и тонкослойный, используется для разделения аминокислот, концентрация которых в плазме крови и моче при различных нарушениях обмена может быть довольно высокой. Особенно велика ценность тонкослойного электрофореза при разделении малых молекул, таких, как аминокислоты и нуклеотиды, поскольку

этот метод отличается быстротой разделения и хорошей разрешающей способностью; кроме того, разделение можно проводить в двух направлениях, что позволяет получать «отпечатки пальцев» гидролизатов белков и нуклеиновых кислот. Тонкослойный электрофорез применяется также для разделения аминов, нафтолов, фенолов и неорганических ионов.

Применение в качестве носителей гелей значительно расширило возможности этого метода и сферу его применения. Большим преимуществом метода является возможность варьирования степени пористости геля, что позволяет улучшать разделение молекул, обладающих близкими зарядами, но различающихся по размерам и (или) форме. Вследствие этого гель-электрофорез чрезвычайно удобен для разделения смесей нуклеиновых кислот (особенно молекул РНК) и белков (включая ферменты, изоферменты и структурные белки). Степень пористости крахмальных и агаровых гелей не удастся контролировать до такой степени, как полиакриламидных, но они также оказались весьма полезными при разделении смесей различных высокомолекулярных соединений.

Электрофокусирование и изотахофорез, обладая хорошим разрешением, применяются при аналитических исследованиях, но, подобно непрерывному электрофорезу, особенно широко используются для препаративных целей. Этими методами можно разделять относительно большие количества материала, который в конце разделения может быть получен обратно. С их помощью успешно проводили выделение пептидов, белков, нуклеотидов и т. д.

Рекомендуемая литература

- Nernberg S. T.*, Electrophoresis: A Practical Laboratory Manual, 2nd edn. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1972.
Sargent J. R., Methods in Zone Electrophoresis. 2nd edn. British Drug Houses Chemicals Ltd., Poole, Dorset, 1969.
Shaw D. J., Electrophoresis. Academic Press, London, 1969.
Smith I., Chromatographic and Electrophoretic Techniques. Vol. 2, 2nd edn. Heinemann, London (1968).
Work T. S., Work E., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 1. North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1969).
 Перечисленные источники содержат подробную информацию о методах и оборудовании, применяемых при электрофорезе. Более детальные сведения о специальных методах, оборудовании и их применении содержатся в серии брошюр Instrument Applications (Shandon Southern Instruments Ltd.) и Science Tools (L.K.B. Instruments Ltd.)

Дополнительная литература

- Маурер Г.*, Диск-электрофорез, пер. с нем., изд-во «Мир», М., 1971.

ДОПОЛНЕНИЕ К ЧАСТИ II

Выбор методов разделения

Выделение и очистка определенного соединения из сложной смеси преследует одну из двух целей. При аналитическом разделении задача состоит в том, чтобы проанализировать вещество качественно и (или) количественно. При этом обычно имеют дело с небольшими количествами вещества, не обязательно задаваясь целью получить его после разделения обратно. При препаративном разделении задача состоит в получении вещества в высокоочищенном состоянии и в максимально возможных количествах, чтобы на следующих этапах исследовать его химические и (или) биологические свойства. При аналитическом и препаративном подходах пользуются разными методами выделения и очистки, и обусловлено это главным образом тем, что при препаративном подходе имеют дело с гораздо большими количествами исходного материала, и нет необходимости применять методы, дающие высокий выход.

Аналитическое разделение

Аналитическое разделение может проводиться качественно, как ускоренный метод идентификации компонентов смеси. Если при аналитическом разделении поведение изучаемого вещества совпадает с поведением некоего известного вещества (стандарта), это означает, что скорее всего эти два вещества идентичны. При оценке поведения этих двух веществ необходимо использовать методы с возможно более высокой разрешающей способностью, а стандартное вещество должно подвергаться в точности такой же обработке и в то же самое время, что и исследуемое соединение. Такой подход позволяет избежать дальнейшего исследования соединения физическими методами для установления его структуры.

Для определения концентрации исследуемого соединения в исходном препарате не всегда необходимо проводить его предварительное выделение и очистку. Если соединение обладает каким-либо уникальным свойством, это свойство можно взять за основу при его количественном определении. Примером таких уникальных особенностей может служить биологическая специфичность: существуют методы количественного определения ферментов в интакт-

ных клетках и клеточных органеллах. В гл. 5 приводятся некоторые спектрофотометрические методы количественного определения белков. В тех случаях, когда таких уникальных свойств у соединения нет, перед проведением количественного анализа это соединение необходимо выделить и очистить.

Любые способы очистки всегда сопряжены с неизбежными потерями материала, поэтому число стадий очистки нужно сводить до минимума. Следовательно, необходимо стремиться применять те методы, которые способны давать самую высокую степень разрешения с небольшим количеством материала. К ним относятся в первую очередь тонкослойная хроматография, тонкослойный электрофорез, газожидкостная хроматография, электрофорез на ацетате целлюлозы, диск-электрофорез, ионообменная и аффинная хроматография. Из них наиболее предпочтительной является, по-видимому, газожидкостная хроматография (в тех случаях, где она применима), так как этот метод обладает высокой разрешающей способностью и чувствительностью и может быть использован как для качественного, так и для количественного анализа. В данном случае особое преимущество дает применение детекторов азота, что позволяет ограничиться минимальной предварительной очисткой.

Аффинная хроматография в тех случаях, когда она применима, особенно ценна для разделения биологических молекул, так как основана на их биологической специфичности. Теоретически этим методом можно добиться полной очистки и высокого выхода. Потенциальные возможности метода использованы далеко не полностью, особенно в отношении его применения для выделения больших количеств материала. Распределительную, адсорбционную и проникающую хроматографии на колонках для аналитических целей, как правило, не применяют вследствие их низкой разрешающей способности и значительных потерь материала.

Препаративное разделение

Методы разделения с высокой разрешающей способностью обычно имеют ограниченную емкость, и для разделения больших количеств материала не используются. При препаративном разделении первая из применяемых стадий обычно имеет большую емкость, но как следствие этого может давать плохое разрешение. Здесь применяют такие методы, как осаждение, диализ, адсорбция, жидкостно-жидкостная хроматография на колонке и противоточное распределение. Хотя их разрешающая способность хуже, чем у многих других, зато они позволяют разделить большие количества материала. На конечных стадиях очистки используют методы с высоким разрешением, например ионный обмен, препаративный гель-электрофорез, препаративную газожидкостную хроматографию.

Методы, применяемые для разделения, должны основываться на всех возможных различиях в свойствах молекул. После применения какого-либо одного из них применение другого, основывающегося на тех же физических свойствах, нецелесообразно, поскольку это скорее всего даст лишь относительно небольшую дополнительную очистку.

Когда встает вопрос о выборе конкретного метода (или методов) очистки вещества, следует иметь в виду, что, хотя в принципе бывает возможно применить несколько методов, предпочтительными оказываются лишь некоторые из них. При этом следует принимать во внимание ряд факторов:

а) с какой целью — аналитической или препаративной — проводится разделение; в зависимости от этого применяют метод с высокой разрешающей способностью и (или) емкостью;

б) физические свойства вещества, например растворимость, летучесть, молекулярный вес и заряд;

в) стабильность исследуемого вещества в данных условиях;

г) имеющиеся в литературе данные по разделению сходных соединений;

д) доступность оборудования;

е) стоимость процедуры.

Ниже приводится таблица, которая составлена с целью помочь читателю подобрать наиболее подходящие методы для разделения некоторых веществ. Нужно подчеркнуть, что эта таблица является только руководством к выбору методов. Вероятно, можно найти частные случаи, для которых рекомендации по применению того или иного метода, даваемые в таблице, не будут соответствовать результатам, полученным экспериментально.

**Руководство к выбору методов разделения
некоторых биологических молекул**

Вещества	Методы								Электрофорез	Ультрацентрифугирование
	Хроматография									
	разделительная (бумага)	адсорбционная (тонкий слой)	адсорбционная (колонок)	пропускающая	газожидкостная	противоточная	ионообменная	аффинная		
Аминокислоты	+	++	—	—	++	++	+++	—	++	—
Пептиды	+	++	—	+	—	—	+++	—	++	—
Белки	—	—	—	++	—	—	++	—	++	++
Пурины и пиримидины	+	++	—	—	—	—	+++	—	++	—
Нуклеиновые кислоты	—	—	—	+	—	—	++	—	++	++
Моно- и дисахариды	++	+	+	—	+	—	+	—	++	—
Олиго- и полисахариды	—	—	—	++	—	—	—	—	—	++
Жирные кислоты	++	++	+	—	++	—	—	—	—	—
Фосфолипиды	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Терпены, каротеноиды, хлорофиллы	+	+++	+++	—	+	+	—	—	+	—
Стероиды и стерины	—	++	++	—	++	+++	—	—	—	—

Часть III

АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Рассмотренные в этом разделе методы широко используются для количественных и качественных исследований биологических систем на молекулярном уровне.

Глава 5

СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Спектроскопия на протяжении вот уже нескольких десятков лет используется химиками для структурных исследований и изучения химических превращений. Главное преимущество спектральных методов состоит в том, что вещество в процессе исследования не разрушается. Кроме того, методику исследований легко модифицировать и автоматизировать. Такие свойства спектроскопических методов делают их незаменимыми при исследовании биологических объектов.

Спектроскопические методы позволяют обнаруживать незначительные количества вещества даже в довольно сложных системах. Так, например, удастся измерять количество восстановленных и окисленных дыхательных пигментов в целых митохондриях.

5.1. Основные принципы

5.1.1. Излучение, энергия и структура атомов

Свет, тепло и другие виды *электромагнитного излучения* представляют собой электромагнитные волны, распространяющиеся со скоростью $3 \cdot 10^8$ м·с⁻¹. Для понимания механизмов, лежащих в основе спектральных свойств молекул, воспользуемся представлением о квантовой природе электромагнитного излучения. Согласно квантовой механике, свет представляет собой поток частиц, называемых *квантами* или *фотонами*. Энергия каждого кванта определяется длиной волны излучения.

В *основном энергетическом состоянии* электроны в атоме занимают самые нижние энергетические уровни, располагаясь на них в

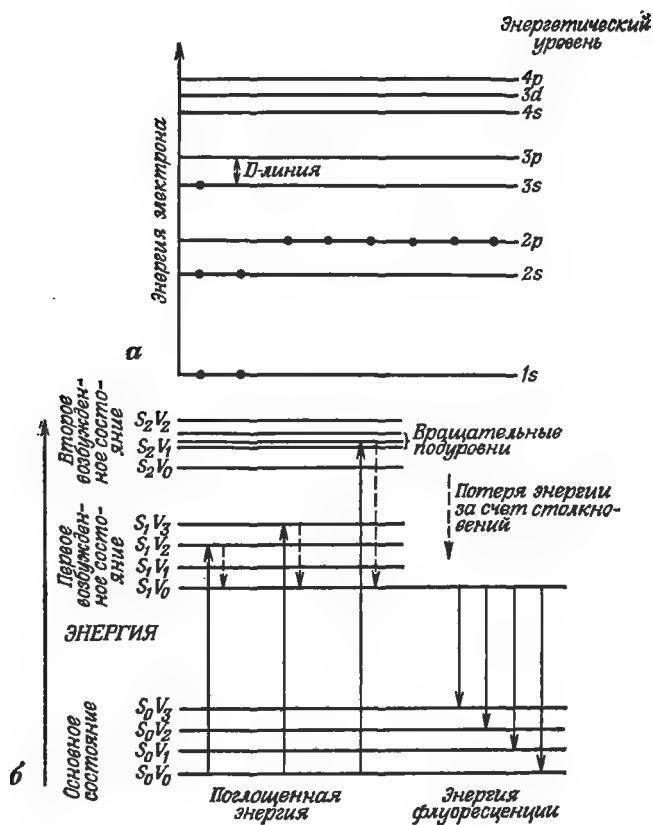


Рис. 5.1. Энергетические уровни и электронные переходы в атоме натрия (а) и флуоресцирующей органической молекуле (б).

Для ясности вращательные подуровни приведены только для колебательного подуровня S_2V_1 .

соответствии с законами квантовой механики. На рис. 5.1,а приведена схема, иллюстрирующая основное энергетическое состояние атома натрия, содержащего 11 электронов. При поглощении кванта энергии электрон переходит из основного состояния в более высокое, возбужденное, при этом энергия кванта должна точно соответствовать разности соответствующих энергетических уровней. Переход электрона из возбужденного состояния в основное сопровождается испусканием кванта, или, иначе говоря, излучением света определенной длины волны.

При образовании молекул электроны атомов занимают новые положения, появляются новые энергетические уровни. Атомы в молекуле могут колебаться и вращаться вокруг связей, и это при-

водит к возникновению около электронных уровней молекулы *колебательных и вращательных подуровней* (рис. 5.1,б). Каждый электрон в молекуле, как и в атоме, занимает самый нижний энергетический уровень, при этом молекула находится в основном состоянии. Приобретая энергию, электрон переходит на более высокий энергетический уровень — другими словами, переходит в возбужденное состояние. Поскольку в молекулах каждое основное и возбужденное электронное состояние разбивается на ряд энергетических подуровней, спектры молекул являются, как правило, *полосатыми*. Из-за отсутствия колебательных подуровней спектры атомов довольно простые, *линейчатые*.

Как и в атомах, в молекулах переход электрона с одного уровня на другой сопровождается поглощением или испусканием кванта энергии. В первом случае мы получаем *спектр поглощения* молекулы, а во втором — *испускания*.

$$E = E_1 - E_2 = h\nu,$$

где E — поглощенная или излученная молекулой энергия, E_1 — первоначальная энергия электрона, E_2 — конечная энергия электрона, h — постоянная Планка, равная $6,63 \times 10^{-34}$ Дж·с, ν — частота колебаний в Гц. Частота колебаний $\nu = \frac{c}{\lambda}$, c — скорость света, равная $3 \cdot 10^8$ м·с $^{-1}$, λ — длина волны излучения, равная $\frac{1}{\nu}$, где ν — волновое число.

Длина волны обычно измеряется в микрометрах (мкм), сантиметрах (см), нанометрах (нм) или ангстремах (Å). Миллимикроны (ммк) и микроны (мк) применять не следует.

5.1.2. Типы спектров и их применение в биологии

Спектр представляет собой зависимость количества поглощенной или излученной системой энергии от длины волны или другого параметра, например волнового числа.

Молекулы взаимодействуют с излучением в широком диапазоне длин волн, поэтому их спектры лежат в разных областях (рис. 5.2). Для измерений в каждом спектральном диапазоне используется специальное оборудование. Одни типы спектров получить довольно легко, и соответствующие методы широко используются биохимики в повседневной работе. Однако есть область спектроскопии, где применяется довольно сложное оборудование. Соответствующие методы используются лишь для детального исследования биологических макромолекул и других субклеточных структур.

Электронные спектры обусловлены переходом электронов наружных оболочек атомов с одного энергетического уровня на другой, и спектры занимают *видимую и ультрафиолетовую* области.

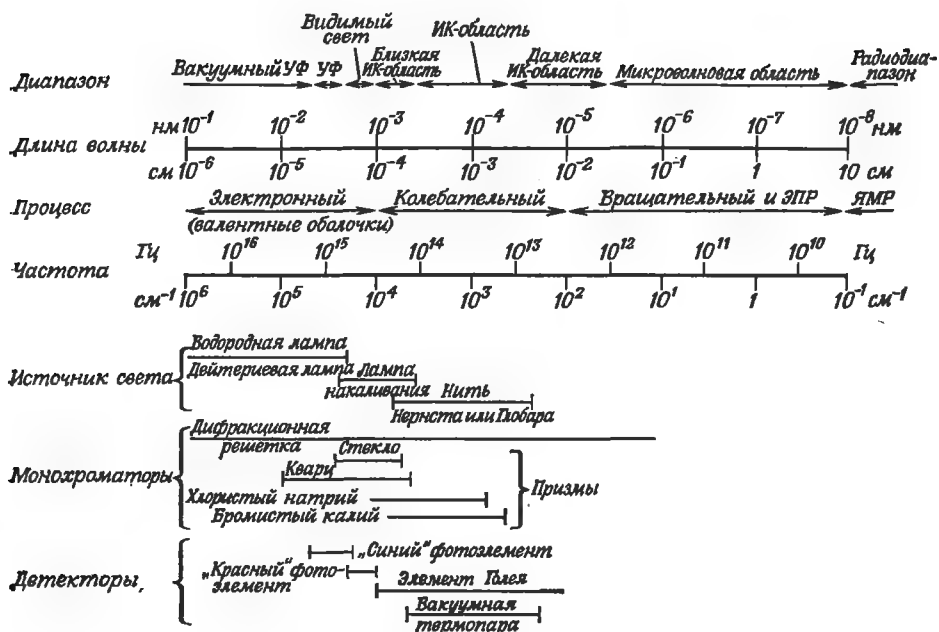


Рис. 5.2. Электромагнитный спектр и спектральные характеристики спектрофотометра.

Обычно электронные переходы сопровождаются изменениями в колебательных и вращательных энергетических уровнях. Эта область спектроскопии широко применяется в биохимии (разд. 5.2—5.6). При переходе электронов в основное состояние происходит испускание света — флуоресценция (разд. 5.3).

Колебательно-вращательные спектры обусловлены изменением энергии колебательных подуровней. Такие переходы, как правило, происходят в ближней инфракрасной области и сопровождаются изменениями вращательных энергетических подуровней. Этот вид спектроскопии обычно используется для изучения структуры биологических макромолекул в неводных средах.

Вращательные спектры располагаются в далекой инфракрасной и микроволновой областях и в биохимии используются редко.

Рамановские спектры (спектры комбинационного рассеяния света) обусловлены изменением колебательных и вращательных подуровней одновременно (разд. 5.5). Такие переходы происходят в ближней инфракрасной области, и рамановская спектроскопия дополняет информацию, полученную с помощью вращательных и колебательно-вращательных спектров. В биохимии рамановская спектроскопия применяется редко.

Спектры электронного парамагнитного резонанса и ядерного магнитного резонанса обусловлены изменением направления спинов соответственно электронов и ядер в магнитном поле. Эти методы являются мощным инструментом при изучении структуры биологических макромолекул (разд. 5.7—5.8).

5.1.3. Основные законы поглощения света

При прохождении света через равномерно поглощающую среду его интенсивность I_0 уменьшается до величины I . Отношение интенсивностей прошедшего и падающего света I/I_0 называется *пропусканием* T . *Поглощение* A или *экстинкция* E — это величина, равная $\lg I_0/I$. Некорректный термин «оптическая плотность» применять не следует.

Согласно закону Ламберта—Бэра, экстинкция пропорциональна концентрации поглощающего вещества и толщине образца, т. е.

$$E = \epsilon cd,$$

где ϵ — коэффициент молярной экстинкции поглощающего вещества при длине волны λ , c — молярная концентрация раствора, d — оптический путь, или толщина образца в см.

Пропускание обычно измеряется в процентах и меняется от 0 до 100%. Экстинкция — величина безразмерная и изменяется от 0 до ∞ . Соотношения между этими величинами приведены в табл. 5.1. Поскольку коэффициент молярной экстинкции, как правило, довольно большой, используют другую величину — поглощение света образцом толщиной в 1 см, содержащим однопроцентный раствор исследуемого вещества $E_{1\text{см}}^{1\%}$.

Таблица 5.1

Связь доли поглощенного света с пропусканием и экстинкцией

Поглощенный свет, %	Пропускание T		$1/T$	Экстинкция $E = \lg 1/T$
	%	доля		
0	100	1,0	1	0,00
25	75	0,75	1,3	0,12
50	50	0,50	2	0,30
75	25	0,25	4	0,60
83	17	0,17	6	0,95
90	10	0,10	10	1,00
95	5	0,05	20	1,30
99	1	0,01	100	2,00
99,9	0,1	0,001	1000	3,00
100	0	0	∞	∞

Закон Ламберта—Бэра применим не для всех систем. Во-первых, при поглощении света образец может ионизоваться, а при высоких концентрациях — полимеризоваться. Иногда образец при облучении коагулирует, образуя мутную суспензию. Эти эффекты увеличивают или уменьшают экстинкцию.

Иногда используемый прибор чувствителен к рассеянному свету или же испускает свет в ограниченном диапазоне длин волн.

5.2. Спектрофотометрия в видимой и ультрафиолетовой областях

Спектр поглощения, или, более корректно, *абсолютный спектр поглощения* вещества представляет собой зависимость количества поглощенного света от длины волны. Такие спектры для красителей в видимой области (400—700 нм) имеют иногда несколько максимумов. Спектры поглощения в ультрафиолетовой (200—400 нм) и видимой областях отражают переходы связанных и несвязанных электронов в молекуле. Это обычно делокализованные π -электроны двойных $C=C$ связей и неподеленные пары азота и кислорода. Поскольку, как правило, электроны в молекуле при комнатной температуре находятся на нижнем энергетическом уровне, спектры в этой области дают информацию об основном и первом возбужденном электронных состояниях молекулы. Ввиду того что длина волны поглощенного света соответствует определенному переходу, пики на спектрах поглощения вещества обусловлены присутствием в нем известных структур. Группа в молекуле, которая дает вклад в спектр ее поглощения, называется *хромофором*. Такой группой является, например, карбонильная группа $>C=O$. При образовании сопряженных связей в молекуле энергия возбужденного состояния электронов уменьшается, и, следовательно, хромофор начинает поглощать свет большей длины волны. Такой сдвиг в спектрах поглощения называется *батохромным*. Наоборот, сдвиг спектра в коротковолновую область именуется *гипсохромным*. *Гиперхромный* и *гипохромный* эффекты — это соответственно увеличение и уменьшение экстинкции. Обнаружить очень близко расположенные линии колебательных и вращательных переходов на спектрах молекул удается лишь при высоком разрешении (разрешением называется способность прибора различить две близко расположенные линии).

5.2.1. Оборудование

Для получения спектра поглощения необходимо измерить экстинкцию при различных длинах волн. Поглощение в видимой и ультрафиолетовой областях можно регистрировать глазом в первом

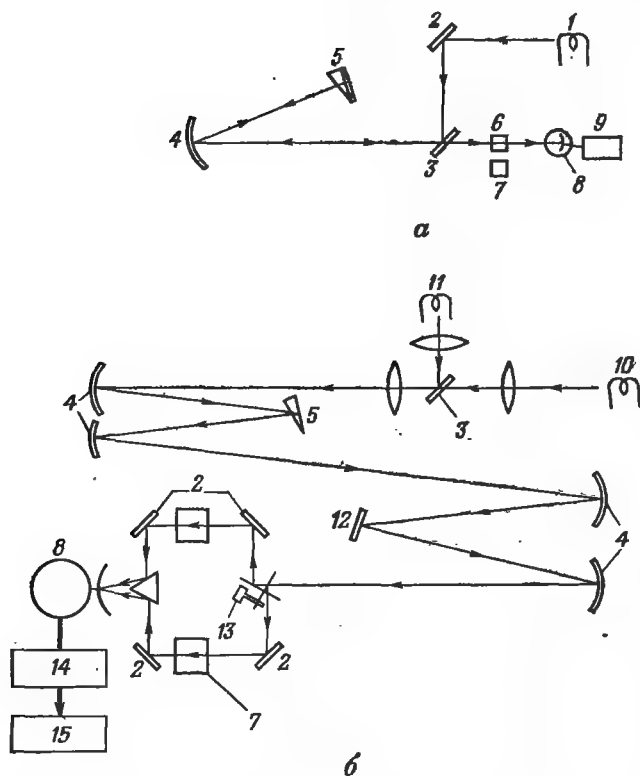


Рис. 5.3. Схема устройства простейшего (а) и регистрирующего (б) спектрофотометров.

1 — лампа; 2 — плоское зеркало; 3 — полупрозрачное плоское зеркало; 4 — фокусирующее зеркало; 5 — отражающая призма; 6 — кювета с образцом; 7 — кювета сравнения; 8 — фотоэлемент; 9 — регистрация; 10 — источник УФ-света; 11 — источник видимого света; 12 — дифракционная решетка; 13 — зубчатое колесо; 14 — усилитель; 15 — самописец.

случае или фотографированием в обоих случаях. Такие приборы называются соответственно *спектроскопами* и *спектрографами*. В *спектрофотометре* индикатором служит фотоэлемент, ток в котором пропорционален интенсивности падающего на него света. На рис. 5.3,а приведена оптическая схема простого спектрофотометра, работающего в видимой области.

В современных приборах линзы, как правило, заменяют зеркалами. Преимущество зеркал перед линзами заключается в их дешевизне и меньшей потере света из-за хроматической аберрации. В качестве источников света в видимой области применяются лам-

пы накаливания, а в ультрафиолетовой — водородные или дейтериевые лампы.

Монохроматоры. Монохроматор — это оптическая система, выделяющая из всего спектра источника света излучение определенной длины волны. Это обычно призмы, по-разному преломляющие свет разных длин волн, или дифракционные решетки. В видимой области используются обычные стеклянные призмы, но в ультрафиолетовой области они не годятся, поскольку стекло начинает поглощать уже при $\lambda < 400$ нм, поэтому призмы делают из кварца. На самом деле к образцу от монохроматора поступает не монохроматическое излучение, а свет в некотором диапазоне длин волн, называемом *спектральной шириной щели*. Ширина щели — важный параметр, поскольку она определяет тот диапазон длин волн, при которых на самом деле проводятся измерения. При анализе спектров используется понятие *ширина полосы* ($\Delta\lambda$) — диапазон длин волн, в котором интенсивность прошедшего света больше половины интенсивности при длине волны максимума пика. Эта величина зависит как от *ширины щели* S , так и от *обратной линейной дисперсии* материала призмы ($d\lambda/dS$). Величина $d\lambda/dS$, как видно из табл. 5.2, зависит от длины волны. Данные таблицы хорошо иллюстрируют также, насколько лучше в видимой области применять стеклянные призмы, чем кварцевые.

Таблица 5.2

Зависимость обратной линейной дисперсии от длины волны

Длина волны, нм	Обратная линейная дисперсия $d\lambda/dS$	
	кварц	стекло
200	0,5	—
300	2,3	—
400	6,2	2,4
500	12,0	5,5
600	21,5	10,0
800	40,0	24,0
1000	55,0	40,0

В качестве монохроматоров применяются также дифракционные решетки, которые представляют собой плоскопараллельную пластину с нанесенными на ней параллельными линиями — бороздками. Белый свет из-за дифракции на параллельных бороздках разлагается в непрерывный спектр. Обычно в монохроматорах сначала выделяют лучок света с определенным диапазоном длин волн с помощью призмы, а затем разлагают его еще раз решеткой. Так получают строго монохроматический свет. Основное достоинство

дифракционных решеток в том, что можно увеличивать их разрешающую способность, поскольку она прямо пропорциональна плотности линий. Кроме того, во всем диапазоне длин волн дифракционные решетки имеют линейное разрешение, тогда как разрешение призменного монохроматора с увеличением длины волны уменьшается.

Кюветы. Исследуемое вещество растворяют в соответствующем растворе и помещают в оптически прозрачный сосуд для измерений — *кювету*. Обычно кюветодержатель имеет ячейки для четырех кювет. Если нет какого-нибудь известного стандартного вещества, для количественных измерений необходимо точно определить размеры кюветы. Для определения поглощения только исследуемого вещества используется кювета сравнения, идентичная кювете с образцом; в нее наливают только растворитель. Перед проведением измерений кюветы сравнивают. Поскольку стекло поглощает ультрафиолетовый свет, для проведения измерений в этой области спектра используют кварцевые кюветы. Для работы с летучими или химически активными веществами кюветы закрывают пробками.

Поскольку кювета, помещенная в спектрофотометр, становится составной частью его оптической системы, с ней нужно обращаться очень аккуратно. Царапины и грязь на стенках кюветы сильно рассеивают и поглощают свет, искажая результаты измерений. Об этом особенно надо помнить при работе в ультрафиолетовой области. Поскольку органические молекулы поглощают в ультрафиолетовой области, ни в коем случае нельзя касаться руками оптических стенок кюветы и вообще стараться по возможности меньше брать кюветы в руки. Раствор лучше заливать в кюветы, поставив их в предварительно вынутый из прибора кюветодержатель. Манипулируя с пипеткой, надо помнить, что кюветы довольно хрупки, особенно кварцевые, поэтому заполнять их нужно, не касаясь стенок пипеткой.

Содержимое кюветы должно быть гомогенным — это необходимое условие получения воспроизводимых данных. Нужно следить за тем, чтобы раствор не был мутным. Особенно мешают измерениям пузырьки воздуха, сильно увеличивающие рассеяние. Нельзя наливать в кювету очень холодный раствор, поскольку при этом на наружных стенках кюветы конденсируются пары воды воздуха, и стенки становятся непрозрачными.

Если кюветы загрязнены посторонними примесями, их следует промыть дистиллированной водой и (или) растворителем, в котором растворено исследуемое вещество. Кюветы можно мыть мягкими серными детергентами, но стараться не пользоваться горячими концентрированными кислотами или щелочами, а также другими травящими агентами.

Как правило, для работы применяют кюветы с оптическим путем 1 см, заливая в них 2,5—3 см³ раствора. В такие кюветы входит

4—5 см³, но заполняют их полностью лишь в том случае, когда это необходимо. Есть кюветы с оптическим путем 100, 20, 5, 2 и 1 мм. В последние — микрокюветы — входит мало вещества, 0,3—0,5 см³, и, конечно, в том случае, когда объем ограничен, эти кюветы очень удобны, например при работе с НАД·Н.

Чтобы спектрофотометр работал хорошо, стабильно и долго, его следует держать в чистой комнате, при постоянной влажности и температуре. Для работы при разных температурах используют специальные термостатированные кюветодержатели. При помощи спектрофотометров можно анализировать соединения после хроматографического разделения их на колонках. Для непрерывного анализа вытекающего из колонок раствора имеются специальные проточные кюветы. В последнем случае результаты измерений целесообразно непрерывно записывать на самописце регистрирующего спектрофотометра.

Фотоэлементы. Фотоэлементы преобразовывают световую энергию в электрическую. Электрический сигнал затем усиливается и регистрируется.

Фотоны, бомбардируя поверхность фотоэлемента, выбивают из нее электроны, количество которых пропорционально интенсивности света. Эти электроны летят к положительному электроду; в результате в замкнутой цепи возникает электрический ток, который регистрируется по падению напряжения на сопротивлении, находящемся в этой цепи. Напряжение можно усилить, и после компенсации такого сигнала потенциометром, отградуированном в единицах поглощения, на датчике регистрируется непосредственно поглощение образца.

Обычные фотоэлементы наиболее чувствительны к свету с длиной волны $\lambda \sim 400$ нм и мало чувствительны к свету с длинами волн $\lambda > 550$ нм. Поэтому для работы в этой области необходимы специальные фотоэлементы, обладающие достаточной чувствительностью в данном спектральном диапазоне. Теоретическая точность таких фотоэлементов $1 \pm 0,003$ единиц поглощения, т. е. 0,3%.

Фотоумножители более чувствительны, чем простые фотоэлементы. Это происходит из-за того, что электроны, вылетевшие из фоточувствительного слоя, ускоряются высоким напряжением, а из-за соударений в газе возникают вторичные электроны, что и приводит к возрастанию тока.

Ширина щели. Измеряемая экстинкция, как правило, зависит от размера щели. Это обусловлено двумя факторами: во-первых, от размера щели зависит диапазон длин волн света, падающего на образец, а, во-вторых, чувствительность фотоэлемента зависит от длины волн. Поэтому для получения надежных данных надо работать при минимально узкой для данных условий экспериментальной щели. Если щель выбрана правильно, при изменении ее размеров вдвое экстинкция не меняется.

Обычно нулевое значение поглощения устанавливают щелью, но в хороших спектрофотометрах это делают, изменяя усиления тока или напряжения фотоэлемента. Такая регулировка позволяет работать при постоянной ширине щели.

Регистрирующие спектрофотометры (рис. 5.3, б). Такие приборы могут регистрировать как изменение поглощения вещества в зависимости от длины волны, так и изменение поглощения во времени при постоянной длине волны. Конечно, регистрирующие приборы очень удобны в работе, но надо помнить, что часто такие спектрофотометры имеют меньшую чувствительность, чем более дешевые однолучевые приборы, поскольку в них из-за автоматической регулировки щели возникают дополнительные шумы. Основная разница между одно- и двухлучевыми приборами состоит в том, что в последних исходный луч при помощи системы плоских зеркал направляется то в кювету сравнения, то в кювету с образцом. Разница в этих прошедших световых потоках, улавливаемых фотоумножителем, соответствует значению поглощения вещества. В хороших спектрофотометрах бумага самописца может двигаться с разной скоростью, поэтому спектры можно растягивать по длинам волн. Изменение чувствительности самописца позволяет усиливать или ослаблять сигнал, поступающий от спектрофотометра, так что на всю его шкалу можно уместить значения экстинкции 0—0,1, 0—1, 1—2 или 2—2,1.

Есть спектрофотометры с автоматической сменой ячеек; на них можно последовательно измерять поглощение нескольких образцов через заданные промежутки времени.

Более сложные спектрофотометры. Иногда бывает необходимо исследовать соединения, поглощающие при длинах волн $\lambda < 200$ нм. В этой области начинает поглощать кислород воздуха, поэтому для измерений в *вакуумном ультрафиолете* из системы нужно откачать воздух. Кварц начинает поглощать ниже 190 нм, но эту трудность можно обойти, изготовив оптические детали из фтористого лития, который прозрачен до 110 нм.

Спектрофотометры, учитывающие отражение, — это приборы, улавливающие свет, рассеянный образцом во все стороны. Такие измерения проводят тогда, когда образец сильно рассеивает в области поглощения (например, суспензия бактерий). В этом случае поглощение находят после измерения всего рассеянного и прошедшего света, и истинное значение оптического пути неизвестно. Этот факт сильно усложняет обработку экспериментальных данных. В качестве сравнения применяется рассеивающая поверхность из окиси магния.

Многолучевой регистрирующий спектрофотометр регистрирует изменение экстинкции одновременно при двух выбранных длинах волн. Выпускаются и приборы, работающие при нескольких длинах волн.

Таблица 5.3

Общие колориметрические количественные определения

Вещество	Реагент	Длина волны, нм	Ссылка
Неорганические фосфаты	Молибдат аммония, H_2SO_4 ; 1,2,4-амино-нафтол, $NaHSO_3$, Na_2SO_3	660	13
Аминокислоты	Нингидрин	570 (пролин 420)	16, 23
Белки (пептидные связи)	Соли меди	620 или 230	20
Фенол, тирозин	$NaOH$, (K, Na) виннокислый, $CuSO_4$	540	10
	Реактив Фолина (фосфомолибдат, фосфовольфрама, соли меди)	660 (750)	14
Белки	Реактив Фолина	660	14
	Биурет	540	10
Углеводы	Фенол, H_2SO_4	Разная (например, для глюкозы — 490, для ксилозы — 480)	7
Восстановленные сахара	Антрон (антрон, H_2SO_4)	620 или 625	3, 19
	Динитросалицилат, щелочной тартратный буфер	540	2
Пентозы]	Биал (орсин, этиловый спирт; $FeCl_3$, HCl)	665	15
Гексозы	Цистеин, H_2SO_4	380—415]	4
	Карбазол, этиловый спирт; H_2SO_4	540 или 440	11
	Цистеин, H_2SO_4	380—415	4
Глюкоза	Молибдат мышьяка	Обычно 500—570	17
	Глюкозоксидаза; пероксидаза; <i>o</i> -дианизидин; фосфатный буфер	420	12
Кетогексоза	Резорцин; тиомочевина, уксусная кислота; HCl	520	18
	Карбазол, этиловый спирт; цистеин; H_2SO_4	560	6
	Дифениламин, этиловый спирт; ледяная уксусная кислота; HCl	635	5
Гексозамины	Реактив Эрлиха (диэтиламинобензальдегид, этиловый спирт; HCl)	530	9
ДНК	Цистеин; H_2SO_4	420	22
РНК	Биал	665	1, 15
α -Окси-кислоты	Динитрофенилгидразин; Na_2CO_3 ; этилацетат	435	8
Стеро-лы	Реагент Либермана—Бухардта (уксусный ангидрид/ H_2SO_4 /хлороформ)	625 425 (гормоны)	21

1. Albaum H. Q., Umbrell W. W., J. biol. Chem., 167, 369 (1947).

2. Bernfield P., Methods in Enzymol., 1, 149 (1955).

3. Dimler R. J., Schaefer W. C., Wise C. S., Rist C. F., Analyt. Chem., 24, 1411(1952).

4. Dische Z., J. biol. Chem., 181, 379 (1949).

5. Dische Z., J. biol. Chem., 204, 983 (1953).

6. Dische Z., Borenfreund E., J. biol. Chem., 192, 583 (1951).
7. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F., Analyt. Chem., 28, 350 (1956).
8. Friedmann J. E., Haugen G. E., J. biol. Chem., 47, 415 (1943).
9. Gardell S., Acta chem. scand., 7, 207.
10. Cornell A. G., Bardawill C. J., David M. M., J. biol. Chem., 177, 751 (1949).
11. Gurin S., Hood D. B., J. biol. Chem., 131, 211 (1939).
12. Hugett A. St. G., Nixon D. A., Biochem. J. 66, 12p (1957).
13. King G. V., Biochem. J., 26, 292 (1932).
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall Roze J., G. biol. Chem., 193, 265 (1951).
15. Meibaum W., Z. physiol. Chem., 258, 117 (1939).
16. Moore S., Stein W. H., J. biol. Chem., 200, 803 (1953).
17. Nelson N., J. biol. Chem., 153, 375 (1944).
18. Roe J. H., Epstein J. H., Goldstein N. P., J. biol. Chem., 178, 839 (1949).
19. Scott T. A., Melvin E. H. Analyt. Chem., 25, 1656 (1953).
20. Spies R. J., J. biol. Chem., 192, 65 (1952).
21. Stadtman Thressa C., Methods in Enzymol., 3, 392 (1957).
22. Stumpf P., J. biol. Chem., 169, 367 (1947).
23. Yemm E. W., Cocking E. C., Analyst, 80, 209, (1955).

Спектрофотометры для измерения поглощения микроскопических объектов имеют очень узкий монохроматический луч и используются в сочетании с микроскопом. На таком приборе можно, например, измерять экстинкцию различных областей клетки.

5.2.2. Применение спектрофотометрии

Основное применение спектрофотометров в лаборатории — точная *колориметрия*, т. е. измерение количества хромофора, образующегося в ходе реакции.

Колориметрия. Многие соединения, слабо поглощающие в видимой области, после реакции с другими веществами дают окрашенные продукты, количество которых однозначно связано с концентрацией исходного вещества. Такую цветную реакцию используют для обнаружения этих веществ. При некоторых стандартных условиях и определенных концентрациях вещества проводят реакцию, а затем измеряют поглощение смеси. В качестве сравнения используют ту же смесь, но без исследуемого вещества. При помощи этого контрольного образца изменением щели устанавливают нулевое значение экстинкции. После ряда измерений строят график зависимости поглощения образца от концентрации исследуемого вещества. Теперь, когда нужно определить количество вещества, в стандартных условиях проводят реакцию, измеряют поглощение образца и по градуировочной кривой определяют концентрацию исходного вещества. В биохимии этот способ применяется довольно часто, поскольку во многих случаях удается подобрать такие реакции, когда незначительные количества вещества дают сильное окрашивание. В табл. 5.3 приведены некоторые часто применяемые цветные реакции. При их проведении необходимо помнить следующее.

1. Измерение поглощения следует проводить в дополнительной для цветной реакции области спектра. Так, если при реакции раствор окрашивается в желтый цвет, нужно измерять поглощение этим раствором синего света.

2. Исследовать цветную реакцию лучше всего в максимуме поглощения — этим достигается наибольшая чувствительность. Если положение максимума неизвестно, его следует определить. Такие предосторожности гарантируют получение хороших результатов даже на малочувствительном приборе.

3. В кювете с контрольным раствором обязательно должны содержаться все компоненты, кроме исследуемого вещества.

4. Контрольный раствор должен быть приготовлен очень тщательно, поскольку от этого зависит получение правильных результатов.

5. Если зависимость линейна, для получения хорошей градуировочной кривой нужно не менее пяти точек. Для нелинейной кривой их нужно существенно больше. Построение градуировочной кривой позволяет исключить точки, поглощение для которых получено ошибочно.

6. Измерение концентрации необходимо проводить дважды, и на кривую наносить оба значения, а не их среднюю величину. Такой способ построения наглядно показывает точность определения концентрации по полученной градуировочной кривой. Кроме того, он позволяет сразу обнаружить неправильные измерения по их сильному отклонению от кривой.

7. Калибровочные кривые, полученные с реагентами разных партий, как правило, не совпадают. Поэтому при смене реагента градуировочную кривую надо получить заново.

8. Наилучшая кривая, проведенная по всем экспериментальным точкам, не обязательно должна точно проходить через нуль. Это связано с тем, что для поглощающего контрольного раствора практически невозможно получить точно такое же соотношение всех компонентов, как для образца.

9. Не следует экстраполировать градуировочную кривую к значениям экстинкции, лежащим выше последних экспериментально полученных точек. Если нет крайней необходимости работать при поглощении, близком к 1,0, все измерения нужно проводить в интервале 0,0—0,6, тогда результаты будут наиболее точными. Это связано с тем, что шкала поглощений логарифмическая.

10. Если поглощение образца лежит за пределами градуировочной кривой, надо заново приготовить раствор такой концентрации, чтобы попасть на градуировочную кривую. Можно поступить проще: разбавить образец, приготовленный для первого определения, одновременно разбавить точно так же и контрольную смесь. Эти операции правомочны, однако, лишь в том случае, если поглощение образца подчиняется закону Ламберта—Бэра. Обе пробы — и ис-

следуемую, и контрольную — правильнее разбавлять таким же раствором, как и в контрольном препарате, но если концентрация реагента не важна, можно разбавлять оба раствора другим растворителем. Лучше, однако, не разбавлять растворы, а воспользоваться тонкими кюветами (с меньшим оптическим путем).

11. В колориметрических определениях воспроизводимость данных более важна, чем выполнение закона Ламберта—Бэра. Как и при всех аналитических процедурах, для экспериментатора важно именно совпадение данных, указывающее на точность количественного определения, а не конкретная схема проведения измерения. Результаты будут идентичны, если экспериментатор работает на исправной аппаратуре, тщательно измеряет все сливаемые объемы и контролирует время и температуру опыта.

Качественный анализ. Спектры в ультрафиолетовой и видимой областях применяются для идентификации соединений или как в чистом виде, так и в составе биологических препаратов. Эта методика используется для определения химической структуры соединения и его превращения, однако для более точного анализа необходимы исследования поглощения в инфракрасной области (разд. 5.4).

Количественный спектрофотометрический анализ. Ряд важных биологических соединений можно полуколичественно изучать с помощью спектрофотометрии в видимой и ультрафиолетовой областях, например, измеряя поглощение белков при 280 нм, а нуклеиновых кислот при 260 нм — длина волн, соответствующих максимуму поглощения этих соединений. Экстинкция белка при 280 нм зависит от содержания в нем ароматических аминокислот — тирозина и триптофана, поэтому значения молярной экстинкции при 280 нм для всех белков различны, и для определения содержания каждого из них требуется индивидуальная калибровочная кривая. Как правило, биохимики работают со смесью белков, и тогда можно пользоваться градуировочной кривой, полученной для белка или смеси белков со средним содержанием тирозина и триптофана. Это может быть, например, сывороточный альбумин или смесь сывороточных белков. Таким образом, для контрольных измерений надо выбирать соответствующий белок. Проводя измерения при длинах волн, где примесь поглощает больше исследуемого вещества, можно с помощью соответствующих формул оценить количество примеси в образце. Так, пользуясь методом Мортон и Стубса, определяют содержание витамина А в омыленных экстрактах природных масел, а по соотношению экстинкций при 260 и 280 нм ($E_{280/260}$) находят содержание белка в препарате нуклеиновых кислот.

Количество двух компонентов, имеющих перекрывающиеся спектры, например хлорофиллы *a* и *b* в эфире, можно оценить, зная их экстинкцию при двух длинах волн. Для *n* компонентов надо иметь данные по поглощению при *n* длинах волн.

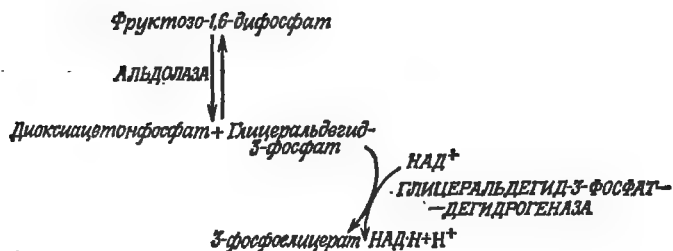
Количественное определение ферментов и кинетический анализ. В том случае, когда продукт или субстрат ферментативной реакции имеет характерный спектр поглощения, можно определить количество присутствующего в смеси фермента, а по спектральным изменениям хромофора в ходе реакции — исследовать и кинетику этой реакции. Количественное определение гидролитических ферментов проводят при помощи реакций расщепления ими синтетических субстратов, в результате которых высвобождается окрашенный продукт (например, α -глюкозидаза отщепляет *p*-нитрофенол от *p*-нитрофенил- α -D-глюкопиранозид).

Количественное определение деполимераз (например, эластазы) проводят по измерению ферментативного высвобождения красителя из комплекса полимера с красителем (эластин—конго красный).

Эти методы используются и в тех случаях, когда непосредственных спектральных изменений в смеси не происходит, но продукт ферментативной реакции участвует в другой реакции, которая уже идет с изменением поглощения. Например, альдолаза катализирует превращение фруктозо-1,6-дифосфата в глицеральдегид-3-фосфат и дигидроацетонфосфат. Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа восстанавливает НАД⁺, и появление НАД·Н сопровождается изменением поглощения при 340 нм. Таким образом, альдолазу можно определить по кинетике появления НАД·Н в присутствии избытка фруктозо-1,6-дифосфата, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы и НАД⁺ (рис. 5.4). Восстановление НАД⁺ или окисление НАД·Н осуществляется в ходе большого числа метаболических реакций. Все описанные измерения можно проводить на довольно дешевых спектрофотометрах, работающих в спектральном диапазоне до 340 нм, и даже пользоваться стеклянными кюветами. Поскольку НАД⁺ и НАД·Н сравнительно дороги, лучше иметь кюветы тоньше 1 см.

Разностные спектры. Основное преимущество разностной спектрофотометрии состоит в том, что с ее помощью можно изучать небольшие изменения поглощения системы с большим значением экстинкции, например изменение окислительного состояния компонентов дыхательной цепи в целых фосфорилирующих митохондриях и хлоропластах.

Разностный спектр получается вычитанием одного абсолютного спектра поглощения из другого, например вычитанием абсолютного спектра поглощения убихинола из спектра убихинона (рис. 5.5). На практике такой разностный спектр получается, если в кювету сравнения поместить одно вещество, в данном случае убихиол, а в кювету для образца — другое, в данном случае убихинон.



а



б

Рис. 5.4. Взаимосвязанные ферментативные реакции, используемые для определения ферментативной активности альдолазы (а) и других ферментов (б).

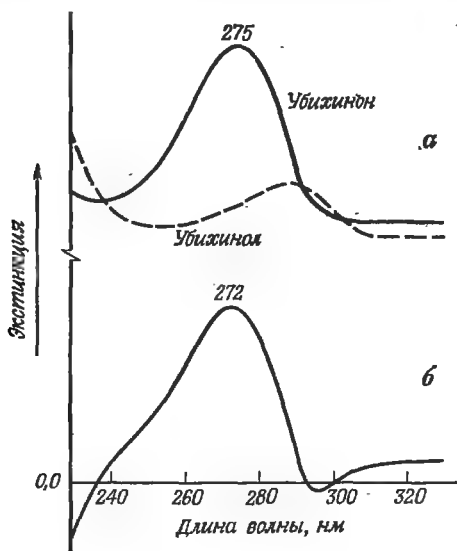


Рис. 5.5. Абсолютные (а) и разностный (б) спектры поглощения убихинона и убихинола.

Рис. 5.5, на котором приведена разность спектров убихинона и убихинола, иллюстрирует следующие основные свойства разностных спектров:

- а) значения экстинкции могут быть отрицательными;
- б) максимумы и минимумы поглощений смещены, а значения экстинкций отличаются от их значений на абсолютных спектрах;
- в) точки нулевого поглощения — *изобестические точки* — отвечают длинам волн, где восстановленные и окисленные формы вещества поглощают одинаково; изобестические точки используются для обнаружения посторонних веществ.

Поместив в кювету сравнения анаэробные митохондрии, а в кювету для образца такие же митохондрии в присутствии окиси углерода, мы получим разностный спектр цитохрома a_3CO и цитохрома a_3 , поскольку цитохром a_3 — последний переносчик электронов в цепи и единственный компонент митохондрий, реагирующий с окисью углерода.

Часто термином «разностный спектр» при исследовании дыхательных систем обозначают разностный спектр *восстановленных и окисленных* форм. Например, разностный спектр цитохрома c означает разницу в поглощении цитохрома $c_{\text{восст}}$ и цитохрома $c_{\text{окисл}}$. Для суспензии митохондрий разностный спектр получается регистрацией при определенных длинах волн изменения поглощения, когда исследуемый объект переходит, напротив, из аэробного состояния в анаэробное; при этом получается «суммарный разностный спектр» для цитохромов a , a_3 , b , c , c_1 , НАД⁺ и флавопротеидов.

Спектры действия. Спектр действия — это зависимость какого-либо неоптического параметра системы от длины волны. Даже для сложных биологических систем такой спектр соответствует спектру поглощения соединения, ответственного за чувствительность системы к свету. Так, изменение скорости выделения кислорода листьями зеленых растений в зависимости от длины волны падающего света эквивалентна спектру поглощения хлорофилла.

Турбидиметрия и нефелометрия (измерение мутности). Очень разбавленные суспензии можно количественно исследовать при помощи турбидиметрии, т. е. измерения экстинкции не в полосе поглощения вещества. К счастью, рассеяние света зависит от длины волны значительно слабее, чем поглощение. Рассеяние света меняется с концентрацией нелинейно, поэтому стандартизовать измерение концентрации разбавленных суспензий по уменьшению интенсивности попадающего на фотозаэлемент света довольно трудно. Концентрацию бактерий обычно оценивают при длине волны 600 нм.

Нефелометрия — это метод измерения интенсивности рассеянного суспензией света; он применяется в основном для определения концентрации микроорганизмов.

5.3. Спектрофлуориметрия

5.3.1. Природа флуоресценции

Флуоресценция — это испускание молекулой света. Спектр флуоресценций соединения сдвинут в длинноволновую область по сравнению со спектром его поглощения; этот сдвиг называется *стоксовым*. Иногда вещество поглощает в ультрафиолетовой области, а испускает видимый свет.

При комнатной температуре большинство органических молекул находится в основном состоянии (на рис. 5.1,б оно обозначено S_0V_0). Поглощение фотона сопровождается переходом электрона на более высокий энергетический уровень (S_1 , S_2 и т. д.). Это происходит за 10^{-15} с. После поглощения кванта молекула из-за теплового движения и столкновения с другими молекулами растрчивает часть энергии и переходит на самый нижний колебательный подуровень первого электронного возбужденного состояния (S_1V_0). Испустив квант за 10^{-8} с, молекула переходит в основное состояние; такое испускание света называется флуоресценцией. Уменьшение энергии кванта, испущенного молекулой, по сравнению с энергией поглощенного кванта и есть стоксовый сдвиг. Флуоресцируют отнюдь не все органические молекулы, хотя большинство из них поглощает в ультрафиолетовой и (или) видимой области.

Поскольку переход с первого возбужденного состояния в основное может происходить на различные колебательные и вращательные подуровни, спектры флуоресценции имеют вид полос. Они обычно не зависят от длины волны возбуждающего света и зеркально симметричны спектрам поглощения.

Спектры флуоресценции несут информацию о процессах, протекающих быстрее, чем за 10^{-8} с. *Квантовый выход* Q — отношение числа испущенных квантов света к числу поглощенных — обычно не зависит от длины волны λ возбуждающего света. При малых концентрациях молекул интенсивность флуоресценции I_f связана с интенсивностью падающего света I_0 соотношением

$$I_f = I_0 \cdot 2,3 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot d \cdot Q.$$

I_f от экстинкции E зависит линейно и составляет примерно $1/100 \times E$, если экстинкция не превышает 0,2. Обычно значение $E = 0,1$ указывается с точностью до 1%, т. е. значение экстинкции 0,101 принимается равным просто 0,1.

5.3.2. Оборудование

Интенсивность флуоресценции сильно зависит от температуры; при уменьшении ее от 30 до 20°C она падает на 10—50%, поэтому

при измерениях необходимо тщательно контролировать температуру.

На рис. 5.6 приведена общая схема устройства флуориметра. Он состоит из:

1) источника света с широким спектральным диапазоном (например, ртутная или ксеноновая лампа);

2) монохроматора M_1 , выделяющего свет определенной длины волны для возбуждения образца;

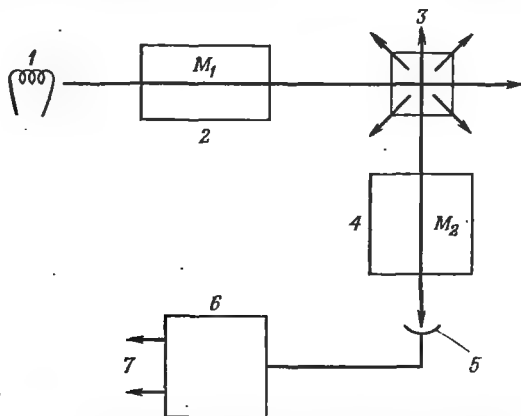


Рис. 5.6. Схема устройства спектрофлуориметра.

1 — источник света; 2 — монохроматор 1; 3 — образец; 4 — монохроматор 2; 5 — фотозлемент-детектор; 6 — усилитель; 7 — к самописцу.

3) второго монохроматора M_2 , который установлен для определения спектра флуоресценции образца при постоянной длине волны возбуждения;

4) детектора — обычно это чувствительный фотозлемент; для измерения же флуоресценции при длинах волн больше 500 нм используется фотоумножитель, чувствительный к красному свету;

5) усилителя.

Для регистрации спектра возбуждения образца его освещают светом различных длин волн; поворачивая монохроматор M_1 , измеряют флуоресценцию при постоянной длине волны (M_2 неподвижен). Спектр флуоресценции снимают при неподвижном M_1 (в этом случае образец освещается светом постоянной длины волны) и измеряют флуоресценцию при различных длинах волн, перемещая M_2 . В самых простых флуориметрах M_2 отсутствует, M_1 заменен фильтром, а в качестве источников света используются ртутная, ксеноновая или водородная лампы. Такой прибор, измеряющий общую интенсивность свечения, применяется для количественных исследований однокомпонентных систем.

5.3.3. Преимущества и недостатки флуориметрии по сравнению со спектрофотометрией

Благодаря тому что интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации вещества, во флуориметрах используется сравнительно простая электроника. Спектрофлуориметрические методы обладают высокой чувствительностью и позволяют работать с крайне малыми концентрациями вещества, когда спектры поглощения регистрировать очень трудно; по флуоресценции можно обнаружить, например, 0,01 мкг катехоламинов или НАД·Н. Чувствительность флуориметров легко менять в широком диапазоне, усиливая ток фотоумножителя. Спектрофлуориметры обладают хорошей спектральной селективностью, поскольку благодаря стоксовому сдвигу можно использовать два монохроматора — один настроенный на длину волны возбуждающего света, а другой — на длину волны флуоресценции. Во флуориметре не требуется кюветы сравнения, но надо иметь калибровочную кривую.

Основная трудность, возникающая при флуориметрических изменениях, — это тушение флуоресценции, когда энергия возбуждения молекул переходит не в световую, а в тепловую энергию их движения.

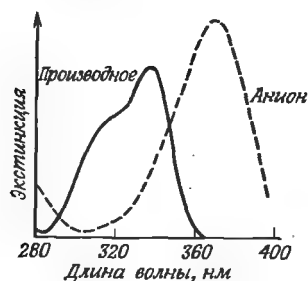
5.3.4. Применение

Качественный анализ. Получение и сравнение спектров флуоресценции и возбуждения соединений позволяет идентифицировать и изучать эти соединения.

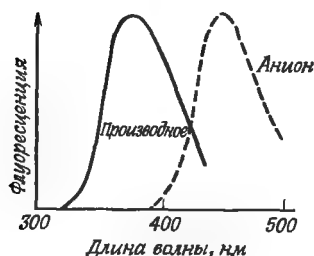
Количественный анализ. Флуориметрия широко применяется в биохимических исследованиях благодаря своей высокой точности, чувствительности и воспроизводимости получаемых результатов. Это особенно важно при работе с малыми количествами вещества, когда спектрофотометрия не дает надежных результатов. В качестве примера можно привести количественное исследование витамина В₁ в пищевых продуктах, НАД·Н в митохондриях и микроорганизмах при различных метаболических условиях, АТФ, хлорофилла и кортикостероидов. Использование внутренних стандартов, т. е. измерение флуоресценции неизвестных количеств чистого вещества до и после добавления определенного количества стандартного образца, позволяет исследовать как самотушение, так и тушение флуоресценции примесями.

Исследование ферментов и кинетический анализ. Группоспецифические гидролитические ферменты можно исследовать по скорости появления флуоресценции аниона 4-метилумбеллиферона при 450 нм. Спектры поглощения и флуоресценции его приведены на рис. 5.7.

НАД⁺- и НАДФ⁺-зависимые реакции (разд. 5.2.1). Поскольку НАД·Н и НАДФ·Н флуоресцируют, спектрометрию можно приме-



а



б

Рис. 5.7. Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) аниона метилумбеллиферона и его производных при pH 10.

нить для изучения различных метаболических реакций, которые так или иначе связаны с окислением НАД·Н или НАДФ·Н или восстановлением их протонированных форм. Благодаря высокой чувствительности метода ферментативные реакции изучают при низких концентрациях субстрата, фермента или кофакторов, т. е. в условиях, близких к протеканию реакций *in vivo*; при этом иногда даже не приходится добавлять экзогенные кофакторы. Метод позволяет изучать кинетику окисления и восстановления эндогенного соединения в интактных органеллах или клетках, например НАД⁺ митохондрий.

Исследование структуры белков. Поскольку некоторые белки содержат флуоресцирующие хромофоры, например тирозин и ФАД, по изменению их флуоресценции можно исследовать связывание белков с такими веществами, как ингибиторы, коферменты и аллостерические факторы. С помощью флуоресценции исследуют также конформацию и полимеризацию белков.

5.4. Инфракрасная спектроскопия

Инфракрасная область электромагнитного излучения делится на ближнюю инфракрасную (1—2 мкм), инфракрасную (2—25 мкм) и дальнюю инфракрасную области (25—250 мкм). Наиболее часто применяется область 2,5—20 мкм.

5.4.1. Природа инфракрасного излучения

Для асимметричной молекулы, состоящей из n атомов, согласно теории молекулярных колебаний, возможны $3n-6$ нормальных колебаний, из которых $2n-5$ приводит к деформации связей и $n-1$ — к их растяжению. На рис. 5.8 эти колебания изображены для двуокиси углерода. Колебания, сопровождающиеся изменением дипольного момента, т. е. смещения заряда, наблюдаются в инфра-

красной области. Другие колебания регистрируются с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния (рамановской спектроскопии). Итак, инфракрасные спектры абсолютно специфичны, поэтому их можно считать своеобразными «отпечатками пальцев» молекул. Инфракрасные спектры для таких простых молекул, как двуокись углерода и вода, идентифицировать довольно просто, но для биохимии интересны молекулы очень большого размера;

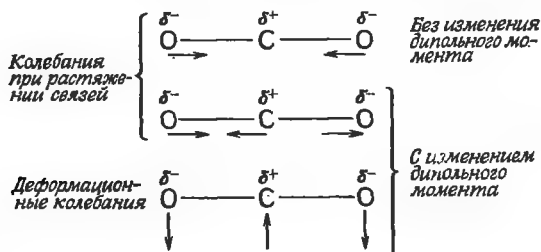


Рис. 5.8. Основные колебания в молекуле двуокиси углерода (стрелки показывают одновременное относительное смещение атомов).

молекула же, содержащая 50 атомов, имеет 144 нормальных колебания.

К счастью, благодаря ряду факторов ситуация существенно упрощается. Некоторые полосы в инфракрасных спектрах разных молекул появляются при одних и тех же длинах волн и относятся к одинаковым группам атомов в молекулах. Это аналогично спектрам поглощения хромофоров. Такие «группы частот» — важный элемент при анализе спектров (поскольку инфракрасные спектры — это колебательные спектры, их принято строить в частотах, а не длинах волн). Весьма полезен для аналитических целей тот факт, что поглощение группы атомов в молекуле зависит от их окружения — частоты колебаний смещаются в ту или иную сторону. Так удастся различить колебания С—Н-связи в группах $=\text{CH}_2$ и $-\text{CH}_3$. При увеличении энергии связи атомов, например при образовании двойных связей, частота колебаний растяжения связей увеличивается, т. е. уменьшается длина волны поглощенного света. При увеличении приведенной массы связанных атомов А и В ($\frac{M_A M_B}{M_A + M_B}$) частота колебаний атомов уменьшается, т. е. поглощается свет большей длины волны. Для любой связи частота колебаний на изгиб (деформационных) меньше частоты колебаний растяжения связей.

5.4.2. Оборудование

Однолучевые приборы обладают рядом недостатков, ограничивающих их применение, и все промышленные инфракрасные спектрофотометры, использующиеся для аналитических целей, двухлучевые. В таких приборах все побочные эффекты, обусловленные растворителем и примесями, автоматически компенсируются, а также снимаются трудности, связанные с сильным поглощением двуокиси углерода и паров воды воздуха.

Источник света. Идеальным тепловым источником является, конечно, черное тело, но интенсивность его излучения очень мала, поэтому используют лампы накаливания. У них максимум в спектре испускания приходится на 2 мкм, и с увеличением длины волны интенсивность излучения сильно падает (при 15 мкм она составляет около 15% от максимальной). Лампы Нернста и Глобара имеют ряд недостатков, поэтому обычно используются источники с нихромовой нитью (рис. 5.2).

Монохроматоры. Первоначально в инфракрасных спектрофотометрах применяли призмы из бромистого калия или хлористого натрия, поскольку стекло для инфракрасного излучения непрозрачно (см. рис. 5.2), однако сейчас в качестве монохроматоров используют в основном дифракционные решетки. Это объясняется не только лучшим разрешением и линейной зависимостью дисперсии от длины волны, но и большей экономичностью решеток. Обычно для устранения интерферирующих лучей, идущих с дифракционной решетки, используют малодисперсные призмы или несколько интерференционных фильтров. Иногда вместо дорогих и непрочных линз из хлористого натрия применяют зеркала из полированного алюминия. Оптическая часть делается по возможности простой, поскольку при каждом отражении теряется 20% света.

Образцы. Образцы нельзя приготавливать в воде, поскольку она, как и органические растворители, очень сильно поглощает в инфракрасной области. Вода растворяет также почти все вещества, прозрачные в этой области спектра. Для уменьшения довольно большого фона, возникающего из-за рассеяния при снятии спектров поглощения в твердых порошках, приготавливают тонко размолотую пасту вещества в парафине или спрессованные диски в бромиде калия. В последнее время нашел применение другой способ снятия спектров, при котором уменьшают общее отражение. Он основан на законах отражения света на поверхности раздела между веществами с сильно различающимися коэффициентами преломления. Этот способ в последние годы значительно расширил область применения инфракрасной спектрофотометрии. Образец следует экранировать от источника света, чтобы его температура не увеличивалась больше, чем на 5°C в 1 ч.

Детекторы. В качестве детектора инфракрасного излучения

используют, как правило, батарею термопар, смонтированную в откачанном баллоне с прозрачным к инфракрасному свету окном. Иногда используется более дорогой и хрупкий элемент Голея. Он представляет собой чувствительный к давлению прибор, который состоит из запаянного резервуара с газом, расширяющимся при нагревании его инфракрасным излучением (см. рис. 5.2).

Ширина щели в спектрофотометрах меняется автоматически, чтобы при сканировании на детектор от кюветы сравнения попадало постоянное количество света.

Самописцы. Обычно самописцы являются составной частью прибора, и движение ленты согласовано с изменением длины волны падающего света. Поскольку выходной сигнал инфракрасных детекторов зависит от энергии нелинейно, в системе регистрации используется сервомотор.

5.4.3. Применение инфракрасной спектрофотометрии в биологии

Несмотря на попытки использовать инфракрасную спектрофотометрию для изучения биологических макромолекул и мембран, основное применение этого метода в биохимии — исследование структуры биологических молекул среднего размера. Он обычно используется в сочетании с ядерным магнитным резонансом и масс-спектрометрией.

5.5. Спектроскопия комбинационного рассеяния (рамановская спектрофотометрия)

Когда видимый монохроматический свет проходит через прозрачную среду, часть его выходит не поглотившись, часть поглощается, а 10^{-6} падающего света рассеивается под прямым углом к падающему пучку. Менее 1% рассеянного света имеют другую длину волны — явление, названное *эффектом Рамана*. Оно обусловлено тем, что возбужденные светом молекулы, потеряв избыточную энергию, не всегда возвращаются на исходный колебательный подуровень, поэтому свет, испускаемый ими, может иметь как меньшую, так и большую длину волны (антистоксовый и стоксовый эффекты). Волновые числа, определяющие отличие рамановских линий от линии возбуждающего света, соответствуют расположению колебательных энергетических подуровней в молекуле и располагаются в инфракрасной области. Регистрируемые этим методом колебания отвечают изменению поляризуемости молекулы, а не дипольного момента. Поэтому рамановские спектры дополняют информацию, полученную с помощью инфракрасной спектроскопии, и также используются для изучения структуры молекул.

Поскольку рамановское излучение очень слабое, соответствующие спектрофотометры появились лишь после развития лазерной техники. Рамановские спектрофотометры регистрируют колебания в видимой и ближней инфракрасной области даже для водных растворов биологических веществ, которые очень сильно поглощают в инфракрасной области. Тем не менее эта методика применяется в биохимии редко. В основном рамановская спектроскопия используется для исследования структуры органических молекул среднего размера.

5.6. Пламенная спектрофотометрия

5.6.1. Принцип метода

Атомы веществ, испаряемые в пламени, испускают или поглощают свет определенной длины волны. Пламенная спектрофотометрия позволяет по интенсивности определенных линий в спектре определять количество отдельных элементов в веществе.

С наибольшей вероятностью элементы поглощают и испускают свет тех длин волн, которые соответствуют наиболее близко расположенным энергетическим уровням, например желтый свет D-линии натрия, отвечающий $3s-3p$ переходу (см. рис. 5.1,а). Поскольку переходы, которые могут совершать электроны в атоме, зависят от расположения занятых и свободных энергетических уровней, атомные спектры для разных элементов строго индивидуальны. Теоретически для простых атомов по расположению линий в спектре можно установить их электронную структуру.

Свет, испускаемый атомом в пламени горелки, можно разложить на набор линий в спектроскопе, спектрографе и спектрофотометре. Эти приборы различаются по способу регистрации спектра, которым являются соответственно глаз, фотопленка и фотоэлемент.

Количество испускаемого света пропорционально числу возбужденных атомов, которое в свою очередь зависит от температуры и состава пламени. Для калибровки установки используется стандартный раствор. Состав пламени очень важен: натрий, например, дает очень большую фоновую эмиссию, поэтому его обычно измеряют в первую очередь и добавляют в одинаковых количествах ко всем стандартным растворам. Соли хлора более летучи, следовательно, исследуемые растворы должны содержать избыток соляной кислоты. Щелочные металлы усиливают эмиссию связанных с ними атомов, тогда как фосфаты, силикаты и алюминаты дают недиссоциирующие соли, тем самым подавляя эмиссию кальция и магния. К счастью, эту трудность можно обойти, добавив *высвобождающие агенты* лантан или стронций.

Для определения количества каждого компонента в образце, когда спектры перекрываются, проводят *циклический анализ*.

Для этого готовят стандартные смеси, содержащие известное количество исследуемых компонентов, проводят несколько оценок, модифицируя состав смеси и постепенно приближая его к соотношению компонентов в образце. Обычно для определения состава образца бывает достаточно двух-трех циклов.

Из-за нестабильности пламени любое определение повторяют не менее трех раз. После окончания измерений следует проверять калибровочные кривые или снимать их снова. Для получения более точных результатов стандартный раствор, содержащий практически подобранное соотношение компонентов, исследуют до и после образца. Если можно, используют и внутренний стандарт; в качестве него обычно применяют литий.

Поскольку хорошо вымытое стекло даже высшего качества связывает и одновременно высвобождает ионы металлов, рекомендуется хранить образцы и стандартные растворы в полиэтиленовой посуде.

При определении металлов в биологических препаратах необходимо сначала сжечь органические молекулы. Это надо делать с осторожностью, чтобы не испарить заодно и легко испаряющиеся элементы. Для этого обугливают органические молекулы при довольно низких температурах в кислороде или жидкости — проводят окислительное разрушение образца смесью перекиси водорода с концентрированной серной кислотой. В качестве катализатора используют сульфат селена, а для повышения точки кипения добавляют сульфат лития.

Атомная абсорбционная спектрофотометрия используется для измерения поглощения монохроматического пучка света атомами в пламени. Поглощенная энергия пропорциональна числу атомов на пути луча.

5.6.2. Оборудование для атомной эмиссионной спектрофотометрии

Составные части атомного (пламенного) эмиссионного спектрофотометра приведены на рис. 5.9.

Распылитель. Это обычный пульверизатор, в котором сжатый воздух, проходя через капилляр, захватывает раствор с образцом. Образующиеся разного размера капли вместе с потоком воздуха попадают в пламя горелки. К сожалению, большие капли образца находятся в самом горячем месте пламени слишком мало времени, чтобы произошло их полное испарение. Поэтому образец пропускают предварительно через камеру с насыщенными парами, в которой большие капли оседают.

Пламя. В табл. 5.4 приведены состав газовой смеси и оптимальные температуры.

Таблица 5.4

Состав газовых смесей и температуры,
используемые в пламенной спектроскопии

Состав смеси	Температура, °C	Определяемые элементы
Воздух/природный газ	1500	Na, K, (Ca)
Воздух/пропан	2000	Ca
Воздух/ацетилен	2500	Ca, Mg, Fe
Окись азота/ацетилен ¹	3000	Ti, V

¹ Используется только в абсорбционном атомном спектрофотометре.

Монохроматоры. Для простого рутинного определения натрия, калия и кальция вместо монохроматоров применяют фильтры, но для более точных измерений нужен призмный или решеточный

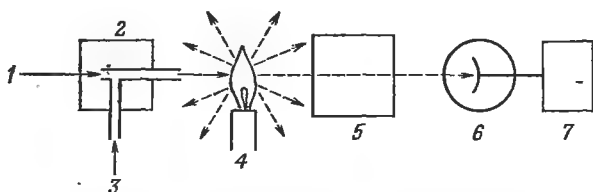


Рис. 5.9. Схема устройства пламенного эмиссионного спектрофотометра.

1 — воздух от компрессора; 2 — распылитель; 3 — образец; 4 — горелка; 5 — монохроматор или фильтр; 6 — детектор; 7 — регистрация.

монохроматор. Самые прецизионные приборы в диапазоне 200—1000 нм имеют разрешение 0,1—0,2 нм. Длины волн света, используемого при анализе ряда металлов, и минимальное содержание элементов в образце, которое еще можно измерить, приведены в табл. 5.5.

Детекторы. Обычно детекторами служат фотоэлементы, но, к сожалению, нестабильность пламени уменьшает их потенциальную точность. При некоторых рутинных измерениях эмиссии до шести элементов одновременно используются многоканальные полихроматоры. Фотопластинки дают нелинейное почернение и применяются только для определения количества атомов с мало различающимися концентрациями.

Таблица 5.5

**Длины волн, использующиеся
в эмиссионной и абсорбционной пламенной спектрофотометрии
для определения различных элементов, и минимальное содержание элементов,
которое можно определить**

Элемент	Эмиссия		Абсорбция	
	длина волны, нм	минимальное содержание элемента в образце ¹ (миллионные доли)	длина волны, нм	минимальное содержание элемента в образце ¹ (миллионные доли)
Алюминий	484,2	30	309,3	1,0
Сурьма			217,5	0,5
Мышьяк			193,6	2,0
Барий	493,4	0,2	553,6	0,4
Кадмий	326,1	10	228,8	0,03
Цезий	852,1	1,0		
Кальций	422,7	0,005	422,7	0,1
Хром	425,6	0,5	357,9	0,2
Кобальт	352,7	0,5	240,7	0,2
Медь	324,8	0,1	324,8	0,1
Индий	451,1	0,2	304,0	1,0
Железо	372,0	0,5	248,3	0,2
Свинец			283,3	0,5
Литий	670,7	0,001	670,7	0,03
Магний	285,2	0,1	285,2	0,01
Марганец	403,3	0,02	279,5	0,05
Ртуть			253,8	10,0
Молибден			313,3	0,4
Никель			341,5	0,2
Калий	766,5	0,001	766,5	0,03
Кремний			251,6	5,0
Натрий	589,0	0,0001	589,0	0,03
Олово			286,3	2,5
Титан			364,3	5,0
Ванадий			318,4	1,5
Цинк			213,9	0,03
Стронций	460,7	0,01	460,9	0,06

¹ В настоящее время благодаря появлению более совершенного оборудования удается обнаружить еще меньшие количества элементов.

5.6.3. Оборудование для абсорбционной атомной спектрофотометрии

Источник света. Для получения узкого пучка света применяется лампа накаливания с двойным монохроматором или разрядная лампа. Разрядная лампа подбирается с учетом специфичности определяемого элемента. Для получения спектра элемента образец помещают в металлическую чашку, а к лампе, наполненной аргоном при низком давлении и содержащей вольфрамовый анод, прикладывают высокое напряжение.

Распылитель и пламя имеют те же отличительные особенности, что и в эмиссионном атомном спектрофотометре. Для увеличения оптического пути используют несколько горелок, однако при этом увеличиваются расход образца и шум прибора. Лучше применять одну горелку с десятисантиметровым пламенем.

Оптическая система и детекторы. Выпускаются как одно-, так и двухлучевые приборы; последние имеют прерыватель луча и специальное приспособление, исключающее регистрацию рассеянного света. Отсчет производится так же, как и в абсорбционном спектрофотометре, т. е. в диапазоне изменения экстинкции от 0 до ∞ . Измерения в основном производятся при длинах волн от 190 до 850 нм.

5.6.4. Применение пламенной спектрофотометрии

Для определения натрия, калия и кальция применяются эмиссионные пламенные фотометры с фильтрами. Сигнал на всю шкалу для натрия и калия получают, используя стандартные растворы, содержащие эти элементы в количестве $1 \cdot 10^{-6}$ и $3 \cdot 10^{-6}$ соответственно. Эмиссионные пламенные фотометры применяются для определения более двадцати элементов, встречающихся при биологических исследованиях, в основном кальция, магния, марганца, индия и таллия.

Как правило, абсорбционные пламенные спектрофотометры чувствительнее, чем атомные эмиссионные; с их помощью удается обнаружить более двадцати элементов, когда содержание их в образце составляет всего 10^{-6} . Исключение составляют щелочные металлы. Воспроизводимость данных составляет 1%, а наилучший рабочий диапазон соответствует содержанию элементов, в 20—200 раз превышающему их предельно обнаружимое количество (табл. 5.5).

Пламенные фотометры наиболее широко используются в клинической биохимии для определения состава крови, мочи, слюны, молока, спинномозговой жидкости и т. д. Эти данные применяются в клинической диагностике, и получаемая информация способствует успешному лечению. Такой контроль необходим при физиологических и фармакологических исследованиях биологических жидкостей. Na, K, Ca, Mg, Cd и Zn определяют прямо в среде, а Cu, Fe, Pb и Hg — после выделения их из биологических жидкостей.

Пламенная спектрофотометрия широко применяется при анализе почвы и растений, но соли металлов из образцов надо предварительно экстрагировать. Этим методом можно определять содержание металлов в макромолекулах, органеллах, клетках и тканях, при этом в каждом случае необходимо правильно выбрать способ первоначального сжигания вещества.

5.6.5. Флуоресцентная атомная спектрофотометрия

В этом случае свет испускается атомами, перешедшими в возбужденное состояние не вследствие нагревания образца, а в результате поглощения света. Само явление аналогично молекулярной флуоресценции, отличие лишь в том, что флуоресцируют атомы в газе, а не молекулы в растворе. Для хорошего анализа необходим достаточно интенсивный источник света, но в отличие от абсорбционной атомной спектрофотометрии, благодаря резонансному поглощению атомов, нет необходимости в хорошем монохроматоре. Модуляция усилителя детектора той же частотой, что и у первичного источника напряжения, исключает регистрацию прямого света от пламени.

Флуоресцентные атомные спектрофотометры имеют очень высокую чувствительность; например, с их помощью можно обнаруживать цинк и кадмий, когда их содержание в образце составляет всего $1 \cdot 10^{-10}$ и $2 \cdot 10^{-10}$ частей соответственно.

5.7. Электронный парамагнитный резонанс

Этот метод применяется для исследования соединений, обладающих *парамагнитными* свойствами, т. е. соединений, магнитный момент которых обусловлен неспаренными электронами. Магнитным моментом могут обладать ионы переходных металлов и их комплексы, свободные радикалы и соединения в возбужденном состоянии.

5.7.1. Принцип метода¹

Электроны обладают зарядом и механическим моментом вращения (спином) и тем самым ведут себя подобно магнитам, а точнее, обладают магнитным моментом. Во внешнем магнитном поле магнитные моменты электронов могут быть ориентированы по направлению магнитного поля или антипараллельно ему. Первая ориентация отвечает более низкому энергетическому состоянию, чем вторая. Переход электрона в более высокое энергетическое состояние с антипараллельным спином происходит при поглощении определенного кванта энергии, и для неспаренного электрона такой резонансный переход требует энергию

$$h\nu = g\beta H;$$

где h — постоянная Планка, ν — частота электромагнитного поля,

¹ Явление электронного парамагнитного резонанса было обнаружено в 1944 г. советским ученым физиком Е. К. Завойским. — *Прим. перев.*

g — константа, фактор спектроскопического расщепления, β — магнитный момент электрона, называемый магнетоном Бора, H — напряженность внешнего магнитного поля.

В магнитном поле с напряженностью 1Т (10^4 Гс) поглощаемая электромагнитная энергия лежит в микроволновом диапазоне. Такое явление поглощения энергии называется электронным парамагнитным резонансом (ЭПР).

Из приведенной выше формулы видно, что частота поглощаемого микроволнового излучения зависит от парамагнетизма образца (β) и напряженности внешнего магнитного поля (H). Обычно частоту поля поддерживают постоянной и снимают зависимость поглощения от напряженности магнитного поля. Поглощение регистрируется в виде пика ЭПР, спектр которого соответствует парамагнетизму образца. Площадь пика зависит от концентрации неспаренных электронов в образце; ее можно определить, если предварительно снять спектр образца, содержащего неспаренные электроны известной концентрации.

Для делокализованного электрона $g = 2,0023$; для связанных электронов, особенно в переходных металлах, g разное, и точное измерение g -фактора дает информацию о характере связывания электрона в молекуле.

Спин-решеточное взаимодействие, т. е. взаимодействие неспаренного электрона с остальной частью молекулы, уширяет пики поглощения на спектрах ЭПР. Величина такого уширения также дает информацию о структуре молекул.

Сверхтонкое расщепление пиков ЭПР, возникающее из-за взаимодействия неспаренных электронов с магнитным полем ядер, дает еще одну возможность для выяснения расположения атомов в молекуле. Сверхтонкое расщепление в свободных радикалах на протонах ^1H наблюдается в поле $3 \cdot 10^{-3}$ Т и дает информацию, аналогичную той, которую получают при помощи ядерного магнитного резонанса с высоким разрешением (ЯМР, см. разд. 5.8). Поэтому методы ЯМР и ЭПР взаимно дополняют друг друга.

5.7.2. Оборудование

Схематически устройство спектрометра ЭПР приведено на рис. 5.10. В этих приборах применяют постоянные электромагниты, дающие поле $50—500$ мТ с точностью 10^{-6} . Как правило, используют электромагнит, дающий постоянное поле 330 мТ, и варьруют его в пределах $10—100$ мТ при помощи дополнительного свип-магнита. Клистроновый осциллятор генерирует электромагнитное излучение в сантиметровом диапазоне, обычная длина волны составляет $3 \cdot 10^{-2}$ м (частота 9000 МГц). Образец должен находиться в твердом состоянии, поэтому биологические объекты замораживают в жидком азоте.

Для удобства анализа спектр представляют в виде зависимости первой производной поглощения dA/dH (а не самого поглощения) от напряженности поля. Поэтому он представляет собой не набор

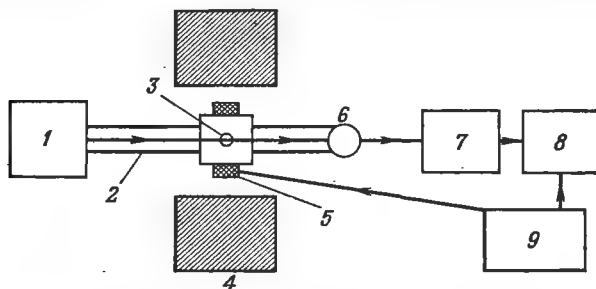


Рис. 5.10. Схема устройства спектрометра электронного парамагнитного резонанса.

1 — кlyтрон; 2 — металлический волновод; 3 — полость для образца; 4 — основной магнит; 5 — дополнительный свип-магнит; 6 — кристаллический детектор; 7 — усилитель; 8 — самописец; 9 — осциллятор.

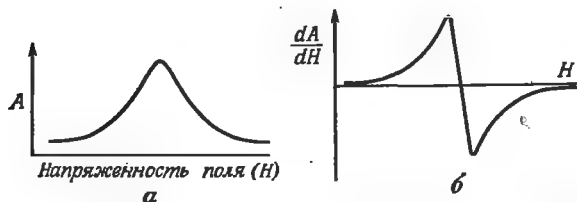


Рис. 5.11. Спектры ЭПР; зависимость поглощения A от напряженности поля H (а) и зависимость первой производной поглощения (dA/dH) от магнитного поля H (б).

симметричных пиков (рис. 5.11,а); а имеет вид, приведенный на рис. 5.11,б.

5.7.3. Применение

Электронный парамагнитный резонанс — один из основных методов, применяемых при изучении металлоферментов, особенно тех, которые содержат молибден (ксантиноксидаза), медь (цитохромоксидаза, медно-голубые ферменты) и железо (цитохромы, ферредоксин). Оба элемента, медь и не входящее в состав гема железо, не поглощают видимый и ультрафиолетовый свет, а в одном из своих окисленных состояний дают пики на спектрах ЭПР. Появление или исчезновение их сигналов ЭПР позволяет изучать

роль этих элементов в работе многоферментных систем интактных митохондрий и хлоропластов, а также изолированных ферментов.

В металлоферментах атомы металлов имеют определенное число лигандов, расположенных по отношению к ним специфическим образом. Такими лигандами обычно являются аминокислотные остатки белков. Применение ЭПР убедительно показало, что пространственное расположение лигандов в металлоферментах часто отличается от того, которое получается в модельных системах. Возможно, такие отличия связаны с определенной биологической функцией металлоферментов.

Применение метода ЭПР расширилось с использованием *спиновой метки* — методики, состоящей в том, что стабильный нереакционноспособный свободный радикал присоединяют к биологической макромолекуле, которая не имеет неспаренных электронов. Так, пометив стабильным радикалом нитроксидом глицерофосфатиды, удалось исследовать их диффузию в мембранах, а также их «перескакивание» между наружной и внутренней поверхностями бислой липидов.

Электронный парамагнитный резонанс широко применяется для исследования свободных радикалов, возникающих под действием облучения. Наконец, в настоящее время появился новый метод, являющийся мощным орудием для изучения структур молекул, — ДЭЯР (двойной электронно-ядерный резонанс), объединяющий ЭПР и ЯМР.

5.8. Ядерный магнитный резонанс

Этим методом регистрируют атомы, ядра которых обладают магнитным моментом. Это, как правило, атомы, имеющие нечетный заряд ядер, т. е. содержащие в ядре нечетное число протонов.

5.8.1. Принцип метода

Поскольку протоны обладают спином и зарядом, они, как и электроны, имеют магнитный момент, но у ядер он примерно в 2000 раз меньше, чем у электронов. В магнитном поле ядро со спином $1/2$ может находиться в двух состояниях; в одном из них магнитный момент направлен параллельно полю, а в другом — антипараллельно. Антипараллельное расположение магнитного момента отвечает более высокоэнергетическому состоянию ядра. Переориентация магнитного момента ядра от параллельного к антипараллельному сопровождается резонансным поглощением электромагнитной энергии. В магнитном поле напряженностью несколько сотен миллитесел (несколько тысяч гаусс) резонансное поглощение ядер происходит в радиодиапазоне электромагнитных колебаний; это

явление называется *ядерным магнитным резонансом* (ЯМР). Большинство исследований проводится с самым легким изотопом — протоном ^1H ; в этом случае принято говорить о *протонном магнитном резонансе* (ПМР). В биохимических исследованиях используется также резонансное поглощение ядер ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F и ^{31}P , спин которых равен $1/2$. Ядра других элементов, часто встречающихся в биологических объектах, такие, как ^{12}C , ^{16}O и ^{32}S , имеют нулевой спин, поэтому не имеют магнитного момента, а следовательно, не дают сигналов ЯМР.

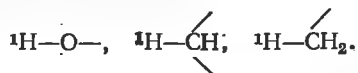
Частота резонансно поглощаемых радиоволн в ЯМР зависит как от типа изотопа, так и от напряженности магнитного поля. Обычно при получении спектров ЯМР частоту радиоволн поддерживают постоянной, а меняют напряженность магнитного поля. Поэтому спектр ЯМР, как правило, — это зависимость поглощенной энергии от напряженности магнитного поля, а не от длины волны или частоты. Диапазон изменения напряженности магнитного поля мал по сравнению с самой напряженностью. Таким образом, спектр характеризуют две величины: частота поглощаемых радиоволн и напряженность магнитного поля. В ПМР-спектроскопии обычно используют радиоволны частотой 40 МГц.

Истинная напряженность магнитного поля, в котором находится ядро, зависит от его окружения и отличается от напряженности, создаваемой внешним электромагнитом. Это обусловлено тем, что при движении электронов, окружающих атомное ядро, создаются локальные магнитные поля, напряженность которых составляет $(15\text{—}20) \cdot 10^{-4}$ Т. Когда равнодействующая локальных магнитных полей направлена против внешнего поля, эффективная напряженность поля у каждого ядра будет ниже, чем внешнее магнитное поле. В этом случае говорят о *диамагнитном экранировании*. Экранирование тем слабее, чем сильнее притягиваются электроны соседними ядрами. В том случае, когда результирующая локальных полей направлена по внешнему полю, резонансный переход происходит при меньшем значении напряженности поля, поэтому говорят о *дезэкранировании*. В результате резонанс одних и тех же ядер в разных химических группах наблюдается при разных частотах, их полосы смещены одна относительно другой. Это смещение измеряется относительно сигнала некоего стандартного соединения и называется *химическим сдвигом*. В ПМР-спектроскопии в органических растворителях таким стандартным спектром является сигнал сильно экранированного протона тетраметилсилана, $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, а в водных растворах используют триметилсилилпропансульфонат



Химический сдвиг выражается обычно в безразмерных единицах — миллионных долях. Шкала самых современных спектрометров прокалибрована в единицах τ . По этой шкале пик $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$

наблюдается при $\tau = 10$, т. е. основные сдвиги происходят между $\tau = 0$ и $\tau = 10$. По спектрам ЯМР удастся различить, например, следующие положения протонов:



По интенсивности пиков, т. е. по их площади можно оценить относительное число протонов ^1H в каждой химической группе.

Спектры ЯМР отражают также *спин-спиновое* взаимодействие ядер через их электронные оболочки. Это взаимодействие на спектрах ЯМР, уже разделенных из-за химического сдвига, проявляется как *сверхтонкое расщепление*. Для разрешения пиков сверхтонкой структуры нужны магниты с сильным полем. Как и спектры ЭПР, спектры ЯМР широко применяются для анализа химических структур. Величина химического сдвига позволяет идентифицировать отдельные химические группы соединения, а интенсивность линий спектров ЯМР дает количественное соотношение таких групп. Сверхтонкая структура спектров ЯМР содержит информацию об окружении ядер, а величина сверхтонкого расщепления позволяет выяснить пространственное расположение различных групп в молекуле. Но как и спектры ЭПР и инфракрасные спектры, ЯМР-спектры очень сложны, и их анализ требует кропотливой и тщательной работы.

5.8.2. Оборудование

На рис. 5.12 схематически изображено устройство спектрометра ЯМР. Для создания постоянного магнитного поля напряженностью 1—10 Т используются электромагниты весом 10^3 — 10^4 кг, стабильность которых лучше 0,1%. Для изменения магнитного поля в пределах 10^{-2} Т применяют дополнительный *сви́п-электро-*

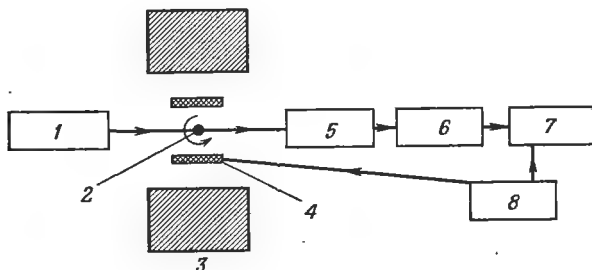


Рис. 5.12. Схема устройства спектрометра ядерного магнитного резонанса.

1 — источник радиоволн; 2 — образец; 3 — основной магнит; 4 — сви́п-магнит; 5 — радиоприемник; 6 — усилитель; 7 — самописец; 8 — сви́п-генератор.

магнит. В качестве источника электромагнитных колебаний используется радиочастотный источник. Образец в высокой концентрации растворяют в растворителе, не содержащем протонов, например D_2O или $CDCl_3$. Для сведения к минимуму влияния колебаний магнитного поля образец помещают в трубку очень точного размера и быстро вращают ее. Поглощение регистрируется радиоприемником, усиливается и записывается на самописце.

Для расшифровки сложных спектров ЯМР применяются *вычислительные машины*, в которые вводят данные по 10^1 — 10^3 спектрам одного и того же образца. Машина эти данные сравнивает и дает средний спектр. Такие ЭВМ-приставки незаменимы при исследовании слабопоглощающих биологических образцов.

5.8.3. Применение

ЯМР-спектроскопия используется в основном для изучения структуры относительно простых органических молекул. Так, при помощи ЯМР удалось исследовать структуру антибиотиков, грамицидина и валиномицина и связать ее с их биологической функцией. С помощью ЯМР-спектроскопии были исследованы влияние аламетицина и холестерина на подвижность лецитина в искусственных и эритроцитарных мембранах, а также относительная подвижность различных частей боковых цепей жирных кислот лецитина в двойном липидном слое. Последнее получено с помощью введения в лецитин в различные положения ^{18}F и ^{13}C .

При применении ЯМР для изучения биологических макромолекул приходится сталкиваться с рядом трудностей. Такие биополимеры, как белки, содержат несколько сотен и даже тысяч протонов, резонансное поглощение которых лежит в узкой области спектра. Применять ЯМР в биологии стало возможно только с появлением высокоразрешающего оборудования с привлечением вычислительной техники. Но даже в этом случае полную сверхтонкую структуру удается получить лишь для молекул, мол. вес которых не превышает 20 000. Так, при изучении механизма катализа рибонуклеазы при помощи ЯМР удалось идентифицировать протонный резонанс от четырех гистидиновых остатков молекул. Это оказалось возможным благодаря тому, что их сигналы были сильно сдвинуты относительно основной массы пиков. Более того, было показано, что два из четырех протонов находятся в каталитическом центре фермента. В действительности это уже было известно из химических данных и рентгеноструктурного анализа, однако полученные результаты являются показателем возможностей ЯМР. Основное преимущество ЯМР перед рентгеноструктурным анализом состоит в том, что при помощи этого метода можно следить за конформационными изменениями, происходящими в пределах 100 пм. Так, многие исследователи считают, что ЯМР может оказаться незаме-

нимым при изучении небольших конформационных изменений, происходящих в мембране в ходе ее функционирования, при исследовании взаимодействия ферментов с субстратами, лекарств с рецепторами и антигенов с антителами.

5.9. Масс-спектрометрия

Масс-спектрометрические методы иногда позволяют получить полное представление о структуре молекул. Применение их в биохимии особенно ценно, поскольку для эксперимента требуется всего 10^{-9} — 10^{-6} г вещества.

Масс-спектр — это набор пиков разной высоты, соответствующих ионам разной массы, поэтому он не похож ни на один из приведенных в этом разделе электромагнитных спектров. К сожалению, при масс-спектроскопическом анализе образец разрушается, но это не такой уж большой недостаток метода, поскольку, как мы уже отмечали, потребляется весьма незначительное количество вещества.

5.9.1. Принцип метода

Первым шагом в масс-спектрометрическом опыте является ионизация вещества; при ионизации наряду с ионами исходного соединения образуются ионизованные «осколки» меньшего молекулярного веса. Как правило, все ионы заряжены положительно, а разделяются они по величине отношения массы к заряду (m/e). Метод позволяет обнаруживать соединение, даже если его доля в образце составляет $\sim 10^{-6}$.

Большинство образующихся ионов однозарядны, т. е. молекулы всех соединений теряют по одному электрону, поэтому ионы различаются только по массе. Иногда, правда, молекулы теряют более одного электрона, образуются многозарядные положительные ионы. Очевидно, для двухзарядного иона отношение массы к заряду вдвое меньше, чем для такого же по массе, но однозарядного иона.

Степень фрагментации молекул при бомбардировке их электронами определяется энергией электронов (разд. 5.9.2). При низких энергиях, $(1-2) \cdot 10^{-18}$ Дж, молекулы просто теряют один электрон, поэтому образовавшийся молекулярный ион имеет m/e , соответствующее молекулярному весу исходного соединения. Обычно вещества бомбардируют электронами с энергией 10^{-17} Дж; в этом случае молекулы распадаются на положительно заряженные фрагменты разной массы. Способ, которым фрагментируется соединение, и, следовательно, его масс-спектр, является индивидуальной характеристикой каждого вещества (можно провести аналогию с характеристическими ИК- и ЯМР-спектрами — своеобразными «отпечатками

пальцев»). С помощью масс-спектра можно затем установить структуру молекулы. Масс-спектры различных соединений собраны в виде каталога, который упрощает расшифровку масс-спектров неизвестных соединений. Для этого в настоящее время используются также вычислительные машины.

Масс-спектр представляет собой ряд пиков или линий, расположенных в соответствии с m/e получающихся осколочных ионов. Высота пика соответствует количеству данного вида ионов. Для калибровки горизонтальной оси по массам используется ион, m/e которого соответствует m/e исходного иона.

Исходный ион на масс-спектре представлен пиком, отвечающим наибольшей массе (основной пик); однако этот ион вовсе не является преобладающим. Интенсивность линий в масс-спектре обычно выражают в процентах по отношению к интенсивности основного пика.

При ионизации двуокиси углерода образуются следующие продукты: CO_2^+ , CO^+ , O_2^+ , O^+ , C^+ ; соответствующие им в масс-спектре линии имеют следующие m/e : 44, 28, 32, 16 и 12. В спектре присутствуют и минорные пики, отвечающие другим естественным изотопам тех же фрагментов: $^{13}\text{C}^+(m/e=13)$ и $^{13}\text{CO}_2^+(m/e=45)$.

5.9.2. Оборудование

На рис. 5.13 схематически представлено устройство масс-спектрометра с необходимой для высокого разрешения двойной фокусировкой. В приборах с одинарной фокусировкой изменяется только магнитное поле, а электростатическое остается постоянным.

Исследования необходимо проводить в высоком вакууме; это обеспечивает минимальное столкновение исследуемых ионов с молекулами газа, что уменьшает потери ионов и предотвращает образование побочных продуктов.

Очень важным фактором для масс-спектрометрического исследования соединения является давление его паров при температуре ионного источника. Если соединение при 100—200°C имеет давление паров около 1,3 Па, его можно поместить в резервуар, связанный с ионизационной камерой. Из-за разности давлений между парами образца в резервуаре и ионизационной камере (в ней поддерживается вакуум $\sim 10^{-5}$ Па) молекулы образца через небольшую диафрагму поступают в ионизационную камеру.

Образцы малолетучих веществ иногда помещают непосредственно в ионизационную камеру на кварцевой подложке и испаряют их.

Органические молекулы обычно ионизуют, бомбардируя их пучком электронов в вакууме (*электронная бомбардировка*). Можно ионизовать вещество, поместив его в сильное электрическое поле (*полевая ионизация*) или облучая ультрафиолетовым светом (*фотоионизация*).

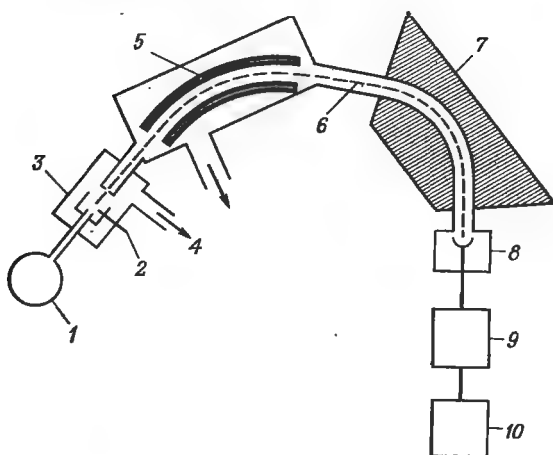


Рис. 5.13. Схема устройства масс-спектрометра.

1 — резервуар с парами образца; 2 — твердый образец; 3 — ионизационная камера; 4 — к вакуумному насосу; 5 — электростатическое поле; 6 — траектория иона; 7 — магнит; 8 — детектор; 9 — усилитель; 10 — самописец.

Разделение ионов в анализаторе в соответствии с величинами их m/e происходит следующим образом. Сначала ионы ускоряются в вакууме с помощью ряда отрицательно заряженных пластин, а затем попадают в магнитное поле, где отклоняются от своей первоначальной траектории. Для ионов, имеющих одинаковый заряд, отклонение зависит только от массы, поэтому легкие ионы отклоняются сильнее. Меняя напряженность магнитного поля или ускоряющего электрического поля, мы тем самым меняем траекторию ионов, и таким образом на щель детектора попадают ионы с определенной величиной m/e . Число регистрируемых детектором ионов зависит от количества образовавшихся ионов данного сорта.

Детектором обычно служит простой электрод (чаша Фарадея) или электронный умножитель. Ионный ток затем усиливается и регистрируется. Поскольку один масс-спектр содержит целый набор пиков сильно различающейся интенсивности, спектры регистрируют с разной чувствительностью, меняющейся обычно в 300 раз. Такой способ обеспечивает наиболее точную регистрацию всех пиков.

Способность масс-спектрометра разделять два иона с мало различающимися массами m_1 и m_2 называется *разрешающей способностью*; она равна $m_1/(m_2 - m_1)$. Разрешающая способность зависит от размера щели детектора, но, сильно уменьшая щель, мы тем самым снижаем чувствительность установки, поскольку уменьша-

ется количество попадающих на детектор ионов. Спектрометры с двойной фокусировкой имеют разрешение 10^5 , а однофокусирующие не превышают 10^4 .

5.9.3. Применение

Впервые масс-спектрометрия в биохимии была применена для изучения метаболических процессов. Вещества, меченные с помощью необычных изотопов, например ^{15}N или ^{18}O , вводили в рацион животных и затем исследовали конечные продукты их метаболизма. Сравнивая непосредственно интенсивности спектров самих метаболитов, содержащих обычный и необычный изотопы, или продуктов их дегградации, например H_2^{18}O и H_2^{16}O , определяли относительное содержание изотопа (отношение количества необычного изотопа к обычному) в различных продуктах метаболизма. В такой методике обычно применяют изотопы ^{15}N и ^{18}O . В тех случаях, когда это возможно, метаболические процессы, однако, лучше исследовать более простым и дешевым способом — с помощью радиоактивных изотопов, например ^{14}C , ^3H , ^{32}P (гл. 6).

В биохимии, как и в физической химии, масс-спектрометрия применяется в основном для определения структуры молекул и, следовательно, идентификации веществ, т. е. для качественного анализа относительно сложных органических молекул. Зная точный молекулярный вес органической молекулы, можно определить ее элементарный состав, имея таблицы точных масс атомов. Таким образом, структура простых молекулярных ионов может быть определена просто из его массы, а структура более сложных органических молекул, таких, как стероиды, убихиноны, триглицериды,— из анализа их осколочных ионов.

Для правильной интерпретации данных по масс-спектрометрии очень важно, чтобы исследуемое вещество было чистым, поэтому целесообразно объединять масс-спектрометр с газожидкостным хроматографом (разд. 3.5.11). Смесь веществ подают на хроматограф, где эти вещества разделяются, а затем поступают в масс-спектрометр. Для такого анализа необходимы быстро сканирующие спектрометры, например диапазон m/e 10 — 10^3 должен регистрироваться за 2—5 с. В этом случае удастся регистрировать образцы, плохо разделяемые хроматографически, снимая масс-спектры первых и последних фракций несимметричного пика. Объединяя масс-спектрометрию с газожидкостной хроматографией, удастся получить отличные масс-спектры вещества, когда количество его составляет всего 10^{-7} г. Поток вещества в ионизационную камеру не должен превышать $1 \text{ мм}^3 \cdot \text{с}^{-1}$, поскольку в ней должен поддерживаться высокий вакуум. Поэтому перед введением хроматографических фракций в масс-спектрометр удаляют газ-носитель при помощи диффузии через мелкопористую перегородку.

В настоящее время масс-спектрометры применяются для анализа последовательности аминокислот в олигопептидах, получающихся в результате гидролиза белков или другим путем. Для повышения летучести пептиды ацетилируют и метилируют. Пептидные связи легко расщепляются при бомбардировке их электронами, причем фрагментация идет с С-конца пептидов. Поскольку все аминокислоты имеют разный молекулярный вес, то по разнице в массах, соответствующих двум соседним основным пикам на спектре, сразу же идентифицируется С-концевая аминокислота более тяжелого фрагмента. Для определения аминокислотной последовательности исходного иона по разнице между основными пиками на масс-спектрах применяются ЭВМ и составлены соответствующие программы. В настоящее время для такого анализа аминокислотной последовательности белков лимитирующей является стадия фракционирования гидролизата белка на отдельные олигопептиды.

5.10. Сводная таблица спектроскопических методов

Тип	Используемый принцип	Область применения
Спектрофотометрия в видимой и ультрафиолетовой области	Энергетические переходы связанных и несвязанных внешних электронов в молекулах. Обычно это делокализованные электроны	Обычный качественный и количественный биохимический анализ, включая многочисленные колориметрические исследования. Количественные определения ферментов и кинетические исследования. Разностные спектры, спектры действия, турбидиметрия и нефелометрия
Спектрофлуориметрия	Испускание света, длина волны которого больше длины волны поглощенного света	Обычный количественный анализ, исследование свойств ферментов, кинетики реакций, конформационной подвижности полимеров. Большая по сравнению со спектрофотометрией чувствительность. Качественный анализ
Инфракрасная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния	Колебания атомов в молекуле, приводящие к изменению дипольного момента и поляризуемости соответственно	Качественный анализ. Идентификация молекул среднего размера по спектрам. В основном применяется в исследовательских целях
Пламенная спектrophотометрия (эмиссия и абсорбция)	Энергетические переходы внешних электронов атомов после испарения вещества в пламени	Качественное и количественное определение металлов, особенно в клинической биохимии. Эмиссионная методика:

Тип	Используемый принцип	Область применения
ЭПР-спектрометрия	Регистрация магнитных моментов неспаренных электронов	простое определение щелочных металлов. Абсорбционная методика расширяет диапазон определяемых металлов и обладает большой чувствительностью Исследование металлосодержащих белков, особенно металлоферментов, и изменений в окружении свободных радикалов, введенных в биологические объекты, например мембраны
ЯМР-спектрометрия	Регистрация магнитных моментов ядер с нечетным числом протонов	Исследование структуры органических молекул, имеющих мол. вес не более 20 000
Масс-спектрометрия	Определение количества положительно ионизованных молекул и их фрагментов	Количественный анализ малых количеств вещества (10^{-6} — 10^{-9} г). Удобно использовать в сочетании с газожидкостной хроматографией. В основном используется в исследовательских целях, но имеется принципиальная возможность определения последовательности аминокислот в белках

5.11. Рекомендуемая литература

- Browning D. R.*, Spectroscopy, McGraw-Hill, London, 1969. (Исчерпывающий обзор всех рассмотренных в этой главе методов — принципов, на которых они основаны, оборудования и химического приложения.)
- Caspersson T., Lornakke G.*, Instrumentation in Biochemistry (Goodwin T.W., ed.), Biochem. Soc. Symp., 26, 25—40. Academic Press, London (1966). (Обзор по микроколичественным спектрофотометрическим методам.)
- Colowick S. P., Kaplan N.O.* (eds.) Preparation and assay of substrates. Methods in Enzymology, 3, Academic Press, New York (1957). (Методика проведения колориметрических измерений.)
- Florkin M., Stotz E.H.* (eds.), Methods for the study of molecules. Comprehensive Biochemistry, 3, Elsevier, Amsterdam (1967). (Обзор всех рассмотренных в этой главе методов.)
- Knowles P. F.*, The Application of Magnetic Resonance Methods to the Study of Enzyme Structure and Function in Essays Biochem., 8, Academic Press, London (1972).
- Schwartz H. M., Nolton J. R., Borg D. C.* Biological Application of Electron

- Spin Resonance, Wiley-Interscience, New York (1972). (Принципиальная основа и применение ЭПР).
- Udenfreud S., Fluorescence Assays in Biology and Medicine, v. 1 and 2, Academic Press, London (1969).

Дополнительная литература

- Физические методы исследования белков и нуклейновых кислот, под ред. Ю. Лазуркина, изд-во «Наука», М., 1967.
- Штерн Э., Тиммонс К., Электронная абсорбционная спектроскопия в органической химии, пер. с англ., изд-во «Мир», М., 1974.
- Юденфренд С., Флуоресцентный анализ в биологии и медицине, пер. с англ., изд-во «Мир», М., 1965.

РАДИОИЗОТОПНЫЕ МЕТОДЫ

6.1. Природа радиоактивности

6.1.1. Структура атомов

Атом состоит из положительно заряженного ядра, окруженного облаком отрицательно заряженных электронов. Практически вся масса атома сосредоточена в ядре, которое по размеру намного меньше атома. Ядро состоит из двух основных компонентов — *протонов* и *нейтронов*. Протон — это положительно заряженная частица с массой в 1850 раз большей, чем масса электрона. Поскольку число протонов в ядре равно числу электронов, атом всегда электрически нейтрален. Число протонов в атоме называется *атомным номером* Z . Нейтрон — это незаряженная частица, масса которой приблизительно такая же, как у протона. Сумма протонов и нейтронов в ядре называется *массовым числом* A ; $A = Z + N$, где N — число нейтронов.

Поскольку число нейтронов в ядре не связано с атомным номером, нейтроны мало влияют на химические свойства атомов. Атомы данного элемента не обязательно содержат одинаковое число нейтронов, т. е. могут отличаться массовым числом; такие атомы называются *изотопами*. Обычно атомы элементов обозначают так: записывают символ элемента, сверху пишут массовое число, а внизу — атомный номер, например:



Число изотопов у разных элементов сильно варьирует. Так, у водорода имеется три изотопа, ${}^1\text{H}$, ${}^2\text{H}$ и ${}^3\text{H}$, у углерода — семь, от ${}^{10}\text{C}$ до ${}^{16}\text{C}$, а у некоторых элементов с большим атомным номером — более 20.

6.1.2. Стабильность атомов и радиация

Как правило, среди всех изотопов элемента имеется всего несколько стабильных природных изотопов. Другие изотопы нестабильны и после одного или нескольких распадов превращаются в стабильные. Большинство таких нестабильных *радиоизотопов* получают искусственно, но некоторые из них имеются в природе, например ${}^{40}\text{K}$. При распаде радиоизотопы испускают частицы или электромагнитное излучение.

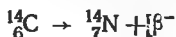
6.1.3. Типы радиоактивного распада

Существует несколько типов радиоактивного распада; ниже мы рассмотрим некоторые из них.

Распад с испусканием негatrona. В этом случае нейтрон превращается в протон с испусканием отрицательно заряженной β -частицы, которую мы будем называть *негатроном* (β^-):

Нейтрон $\rightarrow$ Протон + Негатрон .

Негатроны — это в действительности электроны, но названы они так для того, чтобы подчеркнуть их радиоактивное происхождение и одновременно не путать с орбитальными электронами. При испускании негatrona ядро теряет нейтрон и приобретает протон, и величина N/Z уменьшается, поскольку атомный номер Z увеличивается на единицу, а массовое число A остается неизменным. В биологических исследованиях часто применяется изотоп углерода ^{14}C , который распадается по такой схеме:

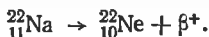


Распад с испусканием позитрона. Некоторые изотопы распадаются с испусканием положительно заряженных β -частиц, называемых *позитронами* (β^+). Позитрон испускается, например, при превращении протона в нейтрон:

Протон $\rightarrow$ Нейтрон + Позитрон.

Позитроны — очень нестабильные частицы, которые «живут» короткое время. Потеряв свою кинетическую энергию, они взаимодействуют с электроном и аннигилируют (исчезают), а вместо них появляются два γ -кванта, разлетающихся в противоположные стороны.

При испускании позитрона ядро теряет протон и приобретает нейтрон, в этом случае N/Z увеличивается, поскольку атомный номер уменьшается на единицу, а массовое число не меняется. Примером такого испускания позитрона служит распад ^{22}Na :



Распад с испусканием α -частиц. Изотопы элементов с большим атомным номером часто распадаются с испусканием α -частиц (α -распад). α -Частица — это ядро атома гелия, т. е. она состоит из двух нейтронов и протонов ($^4_2\text{He}^{2+}$). α -Распад приводит к тому, что ядро становится гораздо легче — атомный номер уменьшается на два, а массовое число — на четыре. α -Активные изотопы в биологических исследованиях применяются редко. α -Частицы испускает изотоп ^{226}Ra , который при этом превращается в ^{222}Rn :



Этот изотоп также неустойчив, и через серию распадов превращается в стабильный изотоп ^{206}Pb .

Распад с испусканием γ -лучей. В отличие от α - и β -распадов γ -распад происходит с испусканием электромагнитного излучения с очень маленькой длиной волны, более жесткого, чем рентгеновское. Это обусловлено тем, что γ -лучи возникают из-за изменения структуры ядра, тогда как рентгеновское излучение связано с переходом электронов. γ -Излучение часто сопровождает α - и β -распад. Одно только γ -излучение ядер не меняет ни атомного номера, ни массового числа.

6.1.4. Энергия радиоактивного распада

Для измерения энергии радиоактивного распада самой распространенной энергетической единицей является *электронвольт* (эВ). Один электронвольт — это энергия, которую приобретает электрон, пройдя разность потенциалов в 1 В; $1 \text{ эВ} = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ Дж}$. Распад большинства изотопов сопровождается выделением энергии, для измерения которой используют более крупную единицу — мегаэлектронвольт; $1 \text{ МэВ} = 10^6 \text{ эВ}$. Обычно самую большую энергию имеют α -частицы, их энергия для разных изотопов варьирует от 4 до 8 МэВ. Энергия β -частиц обычно не превышает 3 МэВ.

6.1.5. Скорость радиоактивного распада

Радиоактивный распад является спонтанным процессом, имеющим характерную для данного изотопа скорость. Количество распавшихся изотопов со временем уменьшается экспоненциально (рис. 6.1). Запишем условие, что число распадающихся в единицу времени атомов пропорционально числу нераспававшихся к этому моменту атомов, т. е. скорость убыли радиоактивных атомов $\left(-\frac{dN}{dt}\right)$ пропорциональна числу радиоактивных изотопов N :

$$-\frac{dN}{dt} = \lambda N, \quad (6.1)$$

где λ — коэффициент пропорциональности, характеризующий вероятность распада изотопа и равный доле атомов, распадающихся в единицу времени.

Проинтегрировав уравнение (6.1), получим

$$\ln \frac{N_t}{N_0} = -\lambda t. \quad (6.2)$$

Здесь N_t — число радиоактивных атомов в момент времени t , N_0 — первоначальное число таких атомов.

Наряду с λ распад характеризуют и другим, более наглядным параметром — *периодом полураспада* $T_{1/2}$, т. е. временем, за которое количество радиоактивных атомов уменьшается вдвое. Подставим в уравнение (6.2) $N_t = \frac{1}{2}N_0$:

$$\ln 1/2 = -\lambda T_{1/2}, \quad (6.3)$$

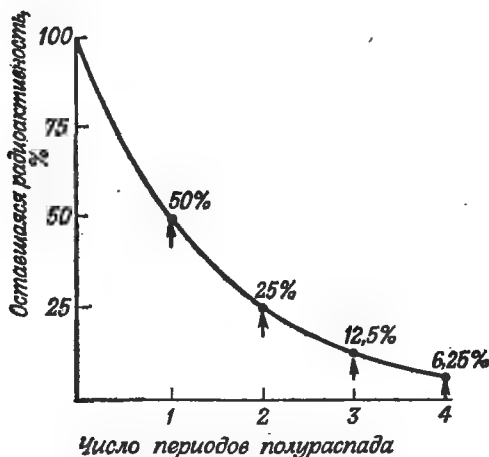


Рис. 6.1. Экспоненциальный характер радиоактивного распада.

или

$$2,303 \lg 1/2 = -\lambda T_{1/2}. \quad (6.4)$$

Таким образом, λ и $T_{1/2}$ связаны между собой следующим соотношением:

$$T_{1/2} = \frac{1}{\lambda} \cdot 0,693. \quad (6.5)$$

Величина $T_{1/2}$ меняется в широких пределах — от 10^{10} лет для радиоактивного свинца (^{204}Pb) до $3 \cdot 10^{-7}$ с для полония (^{212}Po). Время полураспада для изотопов, часто используемых в биологических исследованиях, приведено в табл. 6.1. В таблице отсутствуют два важных элемента, кислород и азот, поскольку период полураспада изотопов этих элементов слишком мал, чтобы их можно было использовать для биохимических целей. Так, для ^{15}O $T_{1/2} = 2,03$ мин, а ^{13}N имеет $T_{1/2} = 10$ мин.

Таблица 6.1

**Период полураспада некоторых изотопов,
используемых в биологии**

Изотоп	Период полураспада	Изотоп	Период полураспада
^3H	12,26 лет	^{43}K	22,40 ч
^{14}C	5730 лет	^{45}Ca	165 дней
^{22}Na	2,58 лет	^{59}Fe	45 дней
^{32}P	14,3 дней	^{130}I	12,5 ч
^{35}S	87,90 дней	^{131}I	8,05 дней
^{42}K	12,40 ч	^{135}I	6,7 ч

6.1.6. Единицы радиоактивности

Кюри (Ки) определяется как такая радиоактивность, при которой в 1 с происходит столько же распадов, сколько в 1 г радия, а именно: $3,7 \cdot 10^{10}$ расп. $\cdot$ с $^{-1}$. В биологических исследованиях пользуются более мелкими единицами: милликюри (мКи), 1 мКи = 10^{-3} Ки, и микрокюри (мкКи), 1 мкКи = 10^{-6} Ки. Необходимо помнить, что кюри характеризует число распадов в образце, а не число распадов, регистрируемых каким-нибудь методом, например счетчиком, который регистрирует число импульсов в 1 с.

Обычно при работе с радиоактивными изотопами к ним добавляют «носитель» — стабильный изотоп этого же элемента. Активность препарата характеризуют при этом так называемой *удельной активностью* — количеством распадов или импульсов в единицу времени (с, мин) на единицу массы вещества (г или моль), или же кюри (или мКи, мкКи) на единицу массы вещества. Реже пользуются другим выражением удельной активности: числом радиоактивных атомов на 100 атомов препарата.

6.1.7. Взаимодействие излучения с веществом

α -Частицы имеют большую энергию (3—8 МэВ), причем у всех частиц данного изотопа она одинакова. α -Частицы взаимодействуют с веществом двояко. Во-первых, они могут *возбуждать* атомы вещества. При этом электроны атомов переходят на более высокие энергетические уровни, и энергия α -частиц уменьшается по крайней мере на величину переданной электрону энергии. При возвращении электрона на исходную орбиталь атом испускает квант света в видимой или ближней ультрафиолетовой области. Во-вторых, α -частицы могут вызывать *ионизацию* атома, т. е. полностью «отрывать» от него электрон; при этом появляется пара ион—электрон. Из-за большого размера α -частиц и двойного положительного заряда они часто сталкиваются с атомами. В результате атомы

вещества возбуждаются или ионизируются, а α -частицы быстро растрачивают свою энергию. Поэтому, несмотря на значительную начальную энергию, α -частицы проникают в образец не слишком глубоко. В табл. 6.2 приведены данные по проникаемости различных образцов для α -частиц.

Таблица 6.2

Толщина слоя вещества,
необходимая для задержания α -частиц с энергией 7 МэВ

Образец	Толщина, мкм	Образец	Толщина, мкм
Воздух	57 000	Медь	14
Алюминий	34	Свинец	2
Слюда	29		

Негатроны. По сравнению с α -частицами негатроны имеют значительно меньшие размеры и большую скорость: они несут один отрицательный заряд. Как и α -частицы, негатроны могут менять электронные состояния атомов и ионизовать их, но из-за большой скорости и малого размера взаимодействуют с веществом слабее α -частиц, поэтому глубже проникают в образец.

Другое отличие негатронов от α -частиц состоит в том, что испускаемые изотопами негатроны имеют широкое *распределение* по энергиям и все β -радиоактивные изотопы имеют свой характерный *спектр* распределения негатронов по энергиям. Максимальное значение энергии ($E_{\max}$) в таких спектрах варьирует от 0,018 МэВ для ^3H до 4,81 МэВ для ^{38}Cl . Причина такого широкого энергетического спектра β -распада была объяснена в 1931 г. Паули, который предположил, что β -распад сопровождается испусканием двух частиц — негатрона и *нейтрино*, между которыми и распределяется энергия $E_{\max}$. При каждом отдельном распаде соотношение в энергиях негатрона и нейтрино различное. Нейтрино, как это следует из названия, не имеет заряда; кроме того, масса его пренебрежимо мала, и оно практически не взаимодействует с веществом.

Гамма-лучи — это электромагнитное излучение, кванты, не имеющие ни массы покоя, ни заряда. Они редко сталкиваются с атомами и успевают пройти довольно большое расстояние до того, как растратят всю свою энергию и, следовательно, глубоко проникают в вещество. Известно восемь способов взаимодействия их с веществом; три из них, являющиеся самыми основными, приводят к появлению *вторичных электронов*, которые затем вызывают возбуждение и ионизацию атомов.

При *фотоэлектронном поглощении* низкоэнергетические γ -лучи взаимодействуют с орбитальными электронами, затрачивая всю свою энергию на фотоэмиссию электрона. Такой электрон уже

является негатроном. При комптоновском рассеянии на электронную эмиссию затрачивается только часть энергии γ -кванта; комптон-эффект наблюдается на γ -лучах средней энергии; рассеянные γ -кванты обладают меньшей энергией и имеют другое направление движения. Высокоэнергетические γ -лучи при столкновении с ядром образуют пару позитрон—негатрон. В этом случае на рождение пары уходит вся энергия γ -кванта.

6.2. Регистрация и измерение радиоактивности

6.2.1. Абсолютный и относительный подсчет распадов

Существуют два способа подсчета числа радиоактивных распадов. При *абсолютном подсчете* регистрируются все распады в исследуемом образце, а при *относительном* — определенная часть их. При абсолютном подсчете применяют счетчики, работающие со 100%-ной эффективностью, или определяют эффективность счета по стандартному образцу, а затем вычисляют абсолютное число распадов. При относительном счете предполагается, что все распады регистрируются с одинаковой эффективностью. Если при проверке окажется, что это не так, нужно использовать абсолютный подсчет.

Для регистрации радиоактивности используют три метода. Два из них количественные и базируются на ионизации газов или возбуждении твердых тел или жидкостей. Третий метод — фотоэмульсионная регистрация — в количественных исследованиях, как правило, не применяется.

6.2.2. Методы, основанные на ионизации газов

Влияние напряжения на ионизацию. Заряженная быстро движущаяся частица, проходя вблизи атома, смещает его электронную оболочку, а иногда даже приводит к ионизации атома. Для рассмотренных частиц ионизирующая способность уменьшается (10 000:1) в следующем порядке: $\alpha > \beta > \gamma$.

Следовательно, α - и β -частицы можно регистрировать газо-ионизационными методами, однако для регистрации γ -излучения эти методы не годятся. Ионизацию можно регистрировать, поместив пару электродов в наполненную газом трубку и приложив к электродам напряжение. Ток в трубке будет расти по мере увеличения числа ионов, образующихся под действием ионизирующей радиации, попадающей в камеру. Такие счетчики в зависимости от величины приложенного напряжения работают в разном режиме (рис. 6.2).

Режим *ионизационной камеры* отвечает такому напряжению между электродами, когда одно столкновение атома с частицей приводит к появлению одного иона. Возникающий при этом ток небольшой, и для его регистрации нужны чувствительные измеритель-



Рис. 6.2. Влияние приложенного напряжения на поток ионов.

ные приборы. В количественных исследованиях эти счетчики используются редко, но такие *электроскопы* полезны для демонстрации свойств радиоактивности. При большом напряжении между электродами возникающие при первичной радиационной ионизации электроны ускоряются в электрическом поле так сильно, что способны ионизовать атомы, попадающиеся им на пути движения к аноду. Вторичные электроны также ускоряются и производят дополнительную ионизацию и т. д. Следовательно, одна первичная ионизация приводит к появлению на аноде большого количества электронов. Такое *усиление в газе* носит название *лавинного эффекта Таунсенда* по имени его открывателя. Из-за эффекта усиления ток в газе очень сильно возрастает. Как видно из рис. 6.2, в *режиме пропорциональности* число ионов в трубке (ток) пропорционально напряжению. При дальнейшем увеличении напряжения достигается плато, когда ток в трубке не зависит от напряжения между электродами. Переходный диапазон напряжений, предшествующий выходу на плато, носит название режима *ограниченной пропорциональности*. В таком режиме количественные исследования проводить некорректно, поэтому останавливаться на нем мы не будем.

Счетчики обычно работают в *режиме пропорциональности*. Основное внимание в таких счетчиках обращается на стабилизацию напряжения, поскольку даже его незначительные колебания существенно меняют усиление.

Режим Гейгера—Мюллера отвечает плато на зависимости тока ионизации от напряжения. Это означает, что появление одного иона приводит к полной ионизации газа; следовательно, в таком режиме счетчик регистрирует все виды ионизирующей радиации, в том числе и β -частицы, и не различает источники радиации, не-

смотря на то что некоторые из них способны образовать один ион, а другие — на много порядков больше.

Поскольку для регистрации распада необходимо, чтобы образовавшийся ион дошел до электрода — а это требует некоторого времени, — то ионы, образующиеся за такой промежуток времени из-за следующих распадов, не регистрируются. Интервал времени, необходимый для регистрации события ионизации, носит название *мертвого времени* счетчика и обычно составляет 100—200 мкс. В пропорциональных счетчиках этот параметр не очень существен, однако для счетчиков Гейгера он играет большую роль, поскольку именно это время определяет полную ионизацию газа — достижение максимального тока. Слабая зависимость от мертвого времени для пропорциональных счетчиков — их основное преимущество при большой скорости счета. При попадании на электрод ионы нейтрализуются, однако некоторые из них минуют электрод и образуют собственную лавину; поэтому в счетчике Гейгера может образоваться *непрерывный разряд*. Для предотвращения такой возможности в трубку добавляют тушитель — газ, уменьшающий энергию ионов. Обычно в качестве тушителей используют этанол, галогены и этилформат.

Поскольку при регистрации радиоактивности счетчики Гейгера—Мюллера применяются наиболее широко, мы рассмотрим их более детально.

Разрядные трубки для счетчиков. Трубки для счетчиков Гейгера—Мюллера довольно разнообразны по конструкции; некоторые из них приведены на рис. 6.3. Наиболее широко используются цилиндрические трубки с прозрачным для излучения торцом — *торцевые трубки*. Материал для торцевой стенки подбирают в зависимости от типа регистрируемого излучения. Так, довольно прочные толстые стеклянные окна пропускают высокоэнергетические электроны, и такие счетчики можно применять для регистрации распада ^{32}P . Для регистрации более мягкого излучения, например β -распада ^{14}C , нужны более прозрачные окна из слюды. Для регистрации утечки радиоактивности в лабораторных условиях применяются в основном *тонкостенные цилиндрические трубки*. Кольцевидные, тонкостенные, погружаемые и жидкостнопроточные типы трубок применяются для регистрации радиоактивности жидких образцов, и поскольку все они изготовлены из стекла, то пригодны для регистрации только довольно жесткого β -излучения. *Вытянутые трубки игольчатого типа* применяются и при работе с небольшими количествами радиоактивного материала и используются в основном для диагностических целей в клинической биохимии.

Сложнее дело обстоит с регистрацией мягкого β -излучения (например, распада ^3H) или α -частиц. Такие частицы задерживаются почти полностью даже очень тонкими окошками, и совсем незначительная их часть попадает в чувствительное к радиации прост-

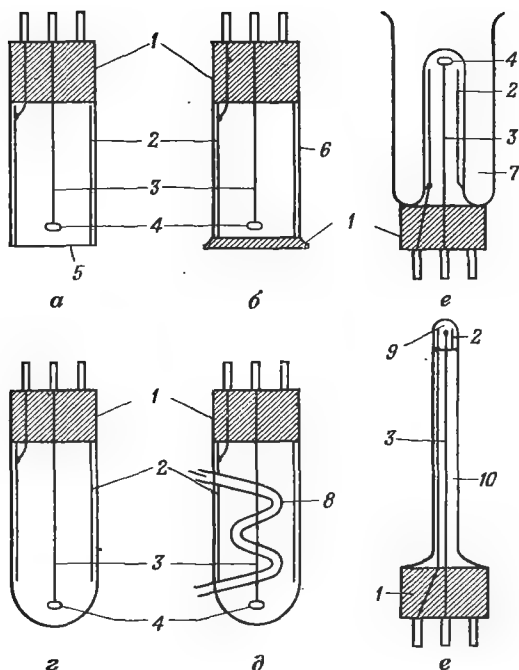


Рис. 6.3. Различные типы трубок счетчиков Гейгера—Мюллера: трубки с торцевым окном (а), тонкостенные трубки (б), кольцевидные (в), тонкостенные погружаемые (г), жидкостнопроточные (д) и трубки игольчатого типа (е).

1 — цоколь; 2 — металлизированный катод; 3 — анод (проволока); 4 — стеклянный шарик; 5 — торцевое окно (стекло, слюда и т. д.); 6 — тонкая стеклянная или металлическая стенка; 7 — объем для жидкого образца; 8 — спиральная трубка для образца; 9 — чувствительный объем; 10 — длинная трубка диаметром 4 мм.



Рис. 6.4. Режим работы счётчика Гейгера—Мюллера.

ранство трубки. Эту трудность можно преодолеть, если совсем удалить окошко и через трубку непрерывно пропускать смесь газов, например гелий с бутаном (2%). Такие счетчики называются *газо-проточными*, но в настоящее время для регистрации мягкого β -излучения стараются применять сцинтилляционные счетчики.

Характеристики трубок. На рис. 6.4 приведена зависимость скорости счета распадов счетчиком Гейгера—Мюллера от разности потенциалов между электродами. Как видно из рисунка, начиная с некоторого потенциала скорость счета резко увеличивается. При такой разности потенциалов разряд в трубке вызывают только самые высокоэнергетические β -частицы. По достижении порогового значения напряжения скорость счета выходит на плато, размер которого достигает 300 В. Конкретный размер плато для каждого счетчика определяется параметрами трубки. При дальнейшем увеличении напряжения число регистрируемых импульсов вновь увеличивается. Это соответствует самопроизвольному разряду в газе, возникающему без дополнительной ионизации его радиоактивными изотопами. Необходимо следить, чтобы счетчик не работал в режиме *непрерывного разряда*, поскольку это приводит к необратимым нарушениям в разрядной трубке.

6.2.3. Методы регистрации, основанные на возбуждении

Некоторые соединения при радиоактивном облучении начинают светиться (флуоресцировать). Флуоресценция под действием радиации называется *сцинтилляцией*. Испускаемый сцинтиллятором свет можно регистрировать фотоумножителем, который преобразует световую энергию в электрический сигнал, пропорциональный интенсивности падающего света. Свечение сцинтиллятора в свою очередь определяется энергией радиации. Тот факт, что регистрируемый электрический импульс связан с энергией радиоактивного распада, является основным преимуществом *сцинтилляционных счетчиков* перед счетчиками Гейгера—Мюллера. Позже мы покажем, что с их помощью можно измерить отдельно радиоактивность каждого из двух и более изотопов, содержащихся в одной пробе (разд. 6.2.3).

Методы сцинтилляционного счета. Существует два основных способа регистрации радиоактивности с помощью сцинтилляторов (рис. 6.5); при одном из них используются твердые, а при другом — жидкие сцинтилляторы. В твердотельных сцинтилляционных счетчиках (внешний сцинтилляционный подсчет распадов) образец помещают в непосредственной близости от кристаллического флуоресцирующего вещества. Для регистрации γ -излучения используется иодистый натрий, α -частиц — в основном сульфид цинка, а для подсчета β -радиоактивности — органические сцинтилляторы, например антрацен. Сам сцинтиллятор находится рядом с фотоумножи-

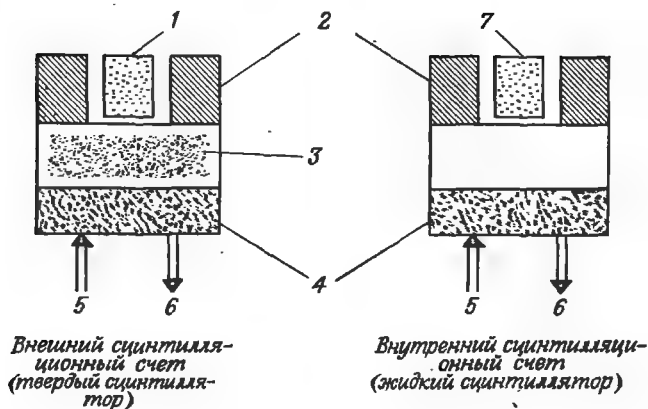


Рис. 6.5. Иллюстрация принципа счета в твердом и жидком сцинтилляторах.

1 — образец; 2 — свинцовая защита; 3 — флуорофор; 4 — фотоумножитель; 5 — источник высокого напряжения; 6 — регистрация; 7 — образец+флуорофор.

телем, сигнал от которого подается на регистрирующее устройство. Твердотельные сцинтилляционные счетчики применяются в основном для регистрации γ -излучения.

В счетчиках с жидким сцинтиллятором (так называемый внутренний сцинтилляционный подсчет распадов) образец помещают в жидкость, содержащую соответствующий сцинтиллятор. Жидкостные сцинтилляционные счетчики незаменимы для регистрации мягкого β -излучения таких широко применяемых в биологических исследованиях изотопов, как ^3H , ^{14}C и ^{35}S . Большинство исследователей, работающих с этими изотопами, имеют дело с жидкостными сцинтилляционными счетчиками повседневно, поэтому стоит специально остановиться на этой методике, хотя надо подчеркнуть, что все сказанное ниже в принципе относится и к твердотельным сцинтилляционным счетчикам.

Перенос энергии в жидкостных сцинтилляционных счетчиках. При бомбардировке частицами — продуктами радиоактивного распада — часть молекул органического растворителя флуоресцирует. Испускаемый свет имеет очень маленькую длину волны и регистрируется имеющимися фотоумножителями с малой эффективностью (рис. 6.6). Если же в органический растворитель добавить вещество, молекулы которого поглощают свет, испускаемый растворителем, и флуоресцируют в более длинноволновой области, то конечную флуоресценцию такой смеси можно регистрировать с большей эффективностью. Такое соединение называется первичным *флуорофором*; обычно это 2,5-дифенилоксазол (РРО). Однако флуоресценция РРО регистрируется все же недостаточно эффективно, поэтому в

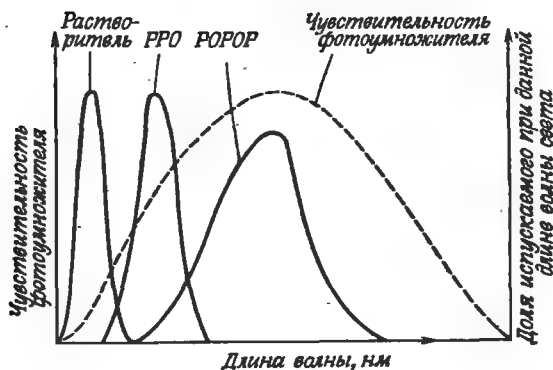
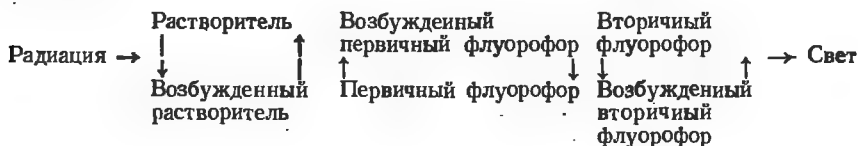


Рис. 6.6. Спектры испускания различных флуорофоров и их связь с чувствительностью фотоумножителей.

смесь вводят еще один компонент — *вторичный флуорофор*, который флуоресцирует с еще большей длиной волны. Вторичным флуорофором для РРО является 1,4-ди-[2(5-фенилоксазоил)]-бензол (РРОРОР). Итак, процесс передачи энергии выглядит следующим образом:



Резонно спросить, зачем нужен первичный флуорофор, если регистрируется свет только вторичного. Оказывается, однако, что растворитель не может передать возбуждение непосредственно на вторичный флуорофор.

РРО и РРОРОР — одни из первых флуорофоров, которые стали применяться в жидкостных сцинтилляционных счетчиках, но и по сей день они широко используются. Недавно появился конкурент — 2-(4'-*t*-бутилфенил)-5-(4''-дифенилил)-1,3,4-оксадиазол; это соединение снискало популярность благодаря тому, что оно, являясь первичным флуорофором, сразу испускает свет подходящей для регистрации длины волны, и, следовательно, отпадает необходимость использовать вторичный флуорофор.

Преимущества сцинтилляционных счетчиков. Уже сам факт, что сцинтилляционные счетчики чрезвычайно широко применяются в биологических исследованиях, указывает на их преимущества перед счетчиками Гейгера—Мюллера. Рассмотрим эти преимущества более подробно.

1. Вывсечивание флуорофора происходит за время, намного меньшее мертвого времени счетчика Гейгера—Мюллера, поэтому можно работать при очень большой скорости счета.

2. Эффективность счета в жидкостном счетчике, как правило, гораздо выше, особенно это относится к низкоэнергетическим β -частицам. Например, на счетчике Гейгера удастся регистрировать распад ^3H с эффективностью, не превышающей 5%, тогда как в жидкостном счетчике она составляет обычно 50%.

3. В сцинтилляционном счетчике можно измерять радиоактивность любых образцов: жидкостей, твердых тел, суспензий, эмульсий, гелей и хроматограмм. В то же время для счетчика Гейгера в каждом случае надо иметь трубку определенного типа, а иногда необходим и ряд дополнительных приспособлений. Следует иметь в виду, что при определении радиоактивности образцов различных типов в жидкостном сцинтилляционном счетчике в каждом отдельном случае сцинтилляционный раствор надо подбирать индивидуально.

4. Образцы для сцинтилляционного счетчика приготавливаются просто.

5. На сцинтилляционном счетчике можно отдельно подсчитать радиоактивность нескольких разных изотопов в образце. Счетчик Гейгера этого сделать не может (причины мы обсудим позже).

Недостатки сцинтилляционных счетчиков. Сцинтилляционный способ регистрации радиоактивности имеет много преимуществ, однако не следует игнорировать и недостатки этого метода, хотя, к счастью, большинство их можно ликвидировать некоторыми конструктивными приемами.

1. Стоимость счета на сцинтилляционном счетчике выше, чем на счетчике Гейгера. Однако такие его качества, как универсальность, высокая эффективность, простота и точность счета, целиком окупают этот недостаток.

2. Когда на фотоумножитель подается высокое напряжение, в нем появляются электроны даже в отсутствие радиоактивности. Этот эффект, называемый *шумом фотоумножителя*, увеличивает фон счета. Для уменьшения шума фотоумножитель можно охладить. Поскольку температура сильно влияет на эффективность счета, термин «охлаждение» означает термостатирование при выбранной температуре (успехи в конструировании фотоумножителей привели к выпуску недорогих счетчиков, работающих при температуре окружающей среды). Однако охлаждение не снижает шумов фотоумножителя до нужного уровня, поэтому применяются другие способы уменьшения фона. Один из них состоит в применении *анализаторов высоты импульса* — приставок, которые отбрасывают большинство шумовых импульсов, как имеющих низкую энергию. Анализаторы работают по *пороговому и целевому* принципам. Однако применение таких приставок чревато тем, что наряду с шумовыми сигналами

отбрасываются слабые сигналы от низкоэнергетических частиц. Второй способ уменьшения шумов — это работа счетчика по *схеме совпадений*; так работает большинство наиболее совершенных и дорогих счетчиков. У них имеется два фотоумножителя, включенных в схему так, что на блок регистрации проходят только те сигналы, которые одновременно идут от обоих фотоумножителей. В таких схемах вероятность регистрации радиоактивного распада гораздо выше, чем шумового сигнала, поскольку возникновение случайных электронов в фотоумножителях происходит независимо, а вероятность одновременного появления их в двух фотоумножителях резко падает, поэтому фон в счетчике сильно уменьшается.

3. Пожалуй, основным недостатком сцинтилляционных счетчиков является *тушение* флуоресценции. Это явление обусловлено потерей энергии возбуждения при ее передаче и возникает по трем причинам. *Оптическое тушение* происходит в том случае, если сцинтилляционные пузырьки грязные. Грязь на стенках пузырьков уменьшает интенсивность флуоресценции до того, как свет дойдет до фотоумножителя. *Тушение красителем* имеет место в том случае, если образец окрашен, так что флуоресцирующий свет поглощается в растворе. Наиболее трудно избавиться от *химического тушения*, когда по тем или иным причинам уменьшается эффективность передачи энергии от растворителя к первичному флуорофору или от первичного флуорофора ко вторичному.

Даже когда все образцы химически идентичны друг другу, а различаются только содержанием радиоактивного изотопа, сравнивать их на основе относительного счета, т. е. числа импульсов в 1 мин, некорректно. Необходимо использовать какой-нибудь способ стандартизации (см. ниже), определить эффективность счета образца, а затем число импульсов в 1 мин перевести в абсолютные единицы — число распадов в 1 мин. Заметим, что в твердотельных сцинтилляционных счетчиках химическое тушение отсутствует.

Счет двойной метки. Сцинтилляционные счетчики позволяют количественно разделить радиоактивность двух изотопов в одном образце. Это оказывается возможным из-за различия в энергетических спектрах частиц, испускаемых разными изотопами. Так, довольно хорошо разделяются спектры ^3H и ^{14}C , ^3H и ^{35}S , ^3H и ^{32}P , ^{14}C и ^{32}P , ^{35}S и ^{32}P . Принцип разделения иллюстрирует рис. 6.7, где приведены слабоперекрывающиеся энергетические спектры двух изотопов S и T . При помощи одного анализатора высоты импульсов отбрасываются все импульсы, энергия которых ниже X (порог X) и выше Y (окно Y). Второй анализатор имеет порог A и окно B . Анализатор высоты импульса, состоящий из порога и окна, называется *каналом*. Для одновременного подсчета распадов двух изотопов нужен двухканальный счетчик. Разделить изотопы можно и на одноканальном счетчике, просчитывая сначала радиоактивность в одном канале, а затем в другом.

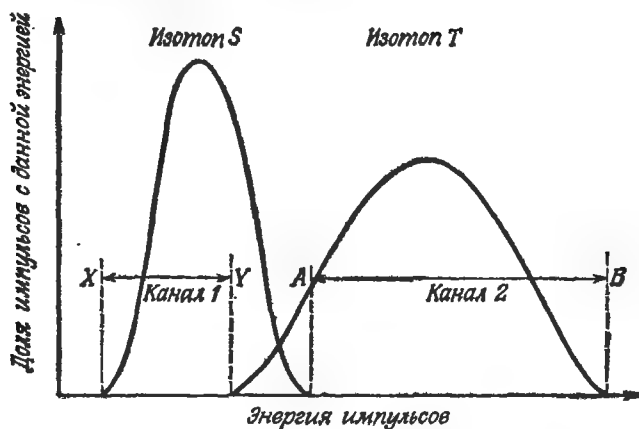


Рис. 6.7. Иллюстрация принципа счета образца с двойной меткой.

Определение эффективности счета. Как было отмечено выше, основным недостатком сцинтилляционных счетчиков является тушение флуоресценции. В связи с этим возникает необходимость определять эффективность счета, если не во всех, то в отдельных опытах. Это делается одним из методов стандартизации.

Внутренняя стандартизация. В этом случае образец просчитывают (число импульсов в 1 мин равно A), извлекают из счетчика, добавляют в него вещество с известной активностью (B распадов в 1 мин) и снова просчитывают (C импульсов в 1 мин). Эффективность счета образца вычисляется по формуле

$$\frac{C - A}{B} \cdot 100.$$

При таком способе определения эффективности надо быть уверенным, что добавляемый стандарт содержит тот же самый изотоп, что и образец, и сам не является тушителем. Для ^{14}C в качестве стандартов применяются ^{14}C -толуол, ^{14}C -гексадекан и ^{14}C -бензойная кислота. Для ^3H имеются следующие стандарты: ^3H -толуол, ^3H -гексадекан и ^3H -вода (бензойная кислота и вода взаимно тушат друг друга и их следует брать в очень малых количествах).

Внутренняя стандартизация является простым и надежным способом и дает правильную поправку для всех видов тушения. Но, с другой стороны, этот метод требует внесения очень точного количества стандарта, а кроме того, на такую проверку уходит много времени — каждый образец просчитывается дважды. Следует иметь в виду также, что образец после добавления стандарта не может быть пересчитан, поэтому в случае ошибки весь опыт нужно ставить заново.

Рис. 6.8. Калибровочная кривая для определения эффективности счета при помощи внешней стандартизации.



Внешняя стандартизация.

Для определения эффективности счета этим методом необходимо иметь калибровочную кривую. Для этого сначала просчитывают контрольный препарат, содержащий только сцинтилляционный раствор (S имп·мин⁻¹), в присутствии γ -активного внешнего стандарта, который помещают за контрольным препаратом. Затем контрольный препарат вынимают из счетчика и добавляют небольшое количество тушителя—анилина, ацетона или судана III. После такой операции еще раз просчитывают контрольный препарат (T имп·мин⁻¹) и вычисляют отношение $\frac{T}{S} \times 100$. Затем в раствор вновь добавляют тушитель и снова считают импульсы. Эту операцию повторяют несколько раз, получая ряд значений $\frac{T}{S} \times 100$, от нулевого тушения до сильного. Затем готовят второй препарат, содержащий известное количество радиоактивного стандарта (X расп·мин⁻¹), просчитывают его (Y имп·мин⁻¹) и вычисляют эффективность счета $\frac{Y}{X} \times 100$. Далее повторяют все те же процедуры, что и с контрольным препаратом, т. е. многократно добавляют тушитель и каждый раз определяют эффективность счета. Из двух серий данных $\frac{T}{S} \times 100$ и $\frac{Y}{X} \times 100$ строят калибровочную кривую, как это показано на рис. 6.8.

При определении радиоактивности экспериментальных образцов сначала определяют число импульсов в отсутствие внешнего стандарта (D имп·мин⁻¹), а затем в его присутствии (E имп·мин⁻¹), после чего просчитывают контрольный образец, не содержащий радиоактивности, в присутствии внешнего стандарта (F имп·мин⁻¹). Затем вычисляют процентное содержание внешнего стандарта в каждом экспериментальном образце $\frac{E-D}{F} \times 100$ и далее по калибровочной кривой определяют эффективность счета.

В большинстве сцинтилляционных счетчиков операции сравнения с внешним стандартом производятся автоматически, поэтому такая методика определения эффективности имеет преимущество перед внутренней стандартизацией. Кроме того, здесь не привносятся никаких ошибок из-за неточного отбора стандартных образ-

цов. Состав каждого образца не меняется, и одна калибровочная кривая годится для всех типов тушения. Нужно помнить, однако, что каждая калибровочная кривая пригодна для счета одного типа изотопов в данном сцинтиллаторе и для данного счетчика — для разных изотопов и различных сцинтилляторов калибровочные кривые разные. Хотя метод внешней стандартизации и имеет свои преимущества, он является наименее точным при определении эффективности счета, особенно если образцы сильно окрашены.

Метод отношения каналов. Тушение, как это видно из рис. 6.9, уменьшает средний энергетический уровень спектра β -частиц. Это уменьшение тем больше, чем сильнее тушение. Этот факт позволяет определять эффективность счета сравнением каналов. Подобно внешней стандартизации, этот метод требует построения калибровочной кривой. Удобнее работать с двухканальным счетчиком, но эти же данные можно получить и на одноканальном счетчике, только образцы приходится просчитывать дважды в разных каналах. Один канал охватывает весь исходный спектр β -частиц, а второй — от трети до половины спектра (соответственно каналы 1 и 2 на рис. 6.9). Образец, содержащий известное количество стандарта (P распл.·мин⁻¹), просчитывают в каждом канале (Q имп.·мин⁻¹ в канале 1 и R имп.·мин⁻¹ в канале 2). Вычисляют эффективность счета в канале 1, равную $(Q/P) \times 100$, и отношение счетов в каналах 2 и 1, равное R/Q . Затем образец вынимают, добавляют к нему некоторое количество тушителя и повторяют измерения. Такие операции проделывают многократно, и в каждом случае вычисляют эффективность счета в канале 1 и отношение каналов. Затем строят калибровочную кривую — зависимость эффективности счета в канале 1 от отношения каналов, рис. 6.10. Эту кривую используют для

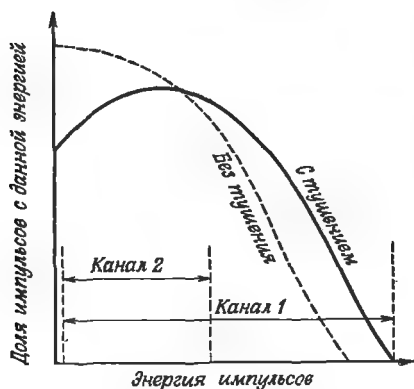


Рис. 6.9. Уменьшение среднего энергетического уровня β -частиц вследствие тушения.

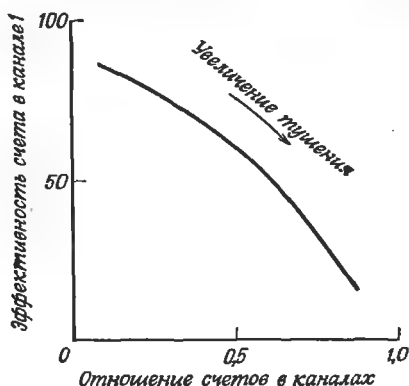


Рис. 6.10. Калибровочная кривая для определения тушения методом отношения каналов.

определения эффективности счета исследуемого образца. Его сначала просчитывают в обоих каналах, определяют отношение числа импульсов в единицу времени и по графику находят эффективность счета. Как и при внешней стандартизации, калибровочная кривая годится только для образцов, содержащих тот же изотоп, сцинтиллятор и т. п., как и при получении калибровочной кривой. Метод отношения каналов пригоден для всех типов тушения и даже при сильном тушении. В двухканальном счетчике образец просчитывают только один раз; поэтому такой метод требует гораздо меньше времени, чем метод внешней или внутренней стандартизации. Метод отношения каналов является наиболее точным методом определения эффективности счета при условии, конечно, что калибровочная кривая снята достаточно тщательно.

Оборудование. Имеющееся в настоящее время сцинтилляционные счетчики настолько разнообразны по конструкции, что нет возможности рассмотреть здесь все типы. Есть, например, одноканальные счетчики с ручным управлением и в то же время — многоканальные, полностью автоматизированные счетчики, измеряющие последовательно до 400 проб. В счетчиках с ручным управлением используют как жидкие, так и твердые сцинтилляторы. Большинство исследователей предпочитают автоматические счетчики, которые имеют ряд преимуществ.

Термостатирующее устройство. О преимуществах счетчиков с охлаждением мы уже говорили. Следует отметить, что они, конечно, более дорогие, чем счетчики без такого устройства.

Программирование автоматических операций. Зачастую приходится работать с препаратами, содержащими изотопы сразу нескольких элементов; многие счетчики имеют соответствующее программное устройство, управляющее сменой каналов для счета разных изотопов.

Конструирование счетчиков в виде блоков. В большинстве случаев при работе с радиоактивными препаратами достаточно одноканального счетчика, однако, если образец содержит несколько разных изотопов, возникает необходимость в счетчике с двумя, тремя и даже четырьмя каналами. Преимущество конструирования счетчиков в виде блоков состоит в том, что можно заменой отдельных блоков переделать одноканальный счетчик в двух-, трех- и даже четырехканальный.

Выходные данные и их обработка. Данные могут быть отпечатаны на бумаге. Иногда их наносят на перфоленту, а затем вводят в ЭВМ. Более сложные счетчики имеют свою вычислительную машину, в которую вводится нужная программа. Это особенно удобно для определения эффективности счета методами внешнего стандарта и сравнения каналов.

Регистрация черенковского излучения. При движении электронов с энергией более 0,5 МэВ в воде наблюдается голубоватое све-

чение, называемое *излучением Черенкова*. Такое свечение, возникающее при жестком β -распаде изотопов, можно регистрировать с помощью обычного сцинтилляционного счетчика. Преимущество этого метода состоит в том, что он не требует дополнительных флуорофоров и в нем отсутствует химическое тушение. Черенковское излучение стало применяться только в последнее время, хотя само явление было открыто Черенковым в 1910 г. В табл. 6.3 приведены некоторые изотопы, β -излучение которых можно регистрировать таким способом. В основном работают с изотопом ^{32}P , 80% β -частиц которого имеет энергию больше черенковской пороговой энергии и регистрируется с эффективностью 40%. Табл. 6.3 хорошо демонстрирует увеличение эффективности регистрации черенковского излучения с ростом доли высокоэнергетических β -частиц.

Таблица 6.3

Некоторые изотопы, дающие черенковское излучение

Радионуклид	E_{max} , МэВ	% β -частиц с энергией $E > 0,5$ МэВ	Эффективность счета, %
^{24}Na	1,39	60	30
^{32}P	1,71	80	40
^{36}Cl	0,71	30	10
^{42}K	3,5	90	80

Некоторые исследователи пытались объединить счетчики Черенкова со сцинтилляционными счетчиками для регистрации двух изотопов в составе одного образца; в принципе это возможно, но на практике осуществить пока не удалось. Изотопы должны быть такими, чтобы максимальная энергия излучения одного из них E_{max} была ниже 0,5 МэВ, а другой испускал высокоэнергетические β -частицы, большинство которых имели бы энергию выше пороговой. Особенно полезен был бы такой счетчик для работы с образцами, испускающими мягкое β -излучение и жесткие γ -кванты. Жесткие γ -частицы можно было бы регистрировать, используя излучение Черенкова (в обычном жидкостном сцинтилляционном счетчике они регистрируются с малой эффективностью), а β -частицы — сцинтилляционным счетчиком. Как правило, γ -излучение регистрируют твердотельным сцинтилляционным счетчиком.

6.2.4. Методы регистрации, основанные на использовании фотоэмульсий

Ионизирующая радиация, как и видимый свет, дает на фотопластинке скрытое изображение; при взаимодействии радиации

с фотоэмульсией образуются электроны, которые восстанавливают ионы серебра в металлическое серебро.

При контакте фотопластинок с тканями, срезами или другими биологическими образцами, содержащими радиоактивные соединения, после проявления пластинок в определенных местах возникают почернения, которые отражают распределения радиоизотопов в объекте. Такой метод называется *авторадиографией*; с его помощью находят распределение радиоактивности в тканях костей, листьях растений, клеточных ядрах; его применяют также в бумажной и тонкослойной хроматографии. Как количественный способ определения радиоактивности этот метод используется редко.

Основное достоинство фотографического метода регистрации состоит в том, что его можно применять для исследования процессов в клетке. Однако, хотя этот метод и прост, он требует большой и тщательной подготовительной работы, например подбора времени экспозиции, приготовления тканей. Надо уметь распознавать такие артефакты, как почернение пластинки от попавшего на нее рассеянного света и следы от пальцев. Фотометод используется на практике для исследования α - и β -активных изотопов.

6.3. Определение радиоактивности на практике и анализ данных

В этом разделе обсуждаются некоторые практические вопросы определения радиоактивности и обработки данных. Основное внимание обращено на те моменты, где обычно возникают трудности.

6.3.1. Определение фона

Все счетчики даже в отсутствие в них радиоактивного образца дают некоторый фоновый счет. Он может быть обусловлен космическим излучением, естественными радиоактивными источниками, связан с расположенной поблизости рентгеновской установкой, а также с электрическими шумами.

Фон можно значительно уменьшить, используя упоминавшиеся уже методы и увеличивая свинцовую защиту, но полностью от него избавиться не удастся, он существует всегда, и его надо учитывать во всех опытах. Некоторые счетчики имеют автоматические устройства для вычитания фона.

6.3.2. Мертвое время

При быстром счете на счетчиках Гейгера часть распадов не регистрируется из-за значительного *мертвого времени* разрядных трубок гейгеровских счетчиков (разд. 6.2). Для таких счетчиков

имеются таблицы поправок, которые вводятся в случае необходимости.

6.3.3. Время полураспада

Время полураспада изотопа (разд. 6.1.5) может быть очень мало, и это необходимо учитывать при анализе данных.

6.3.4. Геометрия

В счетчиках Гейгера с тонкостенными окнами трубок просчитывают твердые образцы; сначала их высушивают, затем кладут на стальные подложки или стеклянные диски, и такие мишени располагают напротив окна трубки. Необходимо, чтобы все образцы по отношению к окну трубки располагались одинаково; в противном случае счет в одинаковых образцах будет сильно различаться из-за того, что часть излучения не попадет в трубку счетчика. Другой важный *геометрический параметр* — площадь поверхности образцов; она у всех должна быть одинаковой.

6.3.5. Самопоглощение

Вопрос о *самопоглощении* возникает только при работе с гейгеровскими счетчиками. Радиоактивные частицы от твердого образца проходят слой воздуха между трубкой и образцом, окошко трубки и только потом попадают в чувствительную зону. Такой путь проходят лишь частицы изотопов, располагающихся на самой поверхности образца. Частицы же, испускаемые изотопами, находящимися внутри образца, должны пройти всю его толщину. Иногда излучение глубоко расположенного изотопа полностью поглощается и не доходит до трубки, поэтому образец должен быть как можно тоньше. Самопоглощение — основная проблема при регистрации низкоэнергетических β -частиц. Эту трудность можно частично преодолеть, уменьшая толщину образца — делая его *бесконечно тонким*.

6.3.6. Статистические вопросы

Испускание частицы — процесс случайный. В этом можно легко убедиться, многократно измеряя радиоактивность долгоживущего изотопа в течение одинаковых промежутков времени. Получающиеся результаты довольно сильно различаются; однако, проделав много измерений, можно убедиться, что все они группируются около некоторого значения числа импульсов. Если результаты таких измерений представить графически, то получится кривая нормального распределения. Таким образом, единичный опыт не дает *истинного числа* импульсов. Пользуясь аналитическим вы-

ражением *распределения Пуассона*, можно показать, что наилучшим значением истинного числа импульсов n является среднее их число $\bar{n}$. Для практических целей можно определить *стандартное отклонение* $\sigma = \sqrt{\bar{n}}$. При нормальном распределении за пределами $\bar{n} \pm \sigma$ лежит только 31,7% всех значений, а за пределами $\bar{n} \pm 2\sigma$ — лишь 5,5%.

Из приведенных выше рассуждений следует, что образец необходимо просчитывать несколько раз. Однако это не всегда удобно, и обычно образец просчитывают один или два раза. Конечно, при этом вычислить σ нельзя. Однако, к счастью, характер распределения Пуассона таков, что стандартное отклонение при единичном измерении n тоже равно $\sqrt{n}$. Иногда пользуются *относительным стандартным отклонением* $\sigma_{\text{отн}} = \frac{100}{\sqrt{n}}\%$. Итак, чем больше

число импульсов n , тем меньше σ , поэтому для измерения радиоактивности с выбранным отклонением σ_0 можно просто набрать в одном счете такое число импульсов n_0 , что $\sigma_0 = \sqrt{n_0}$.

Обычно опыты с радиоактивностью проводят так, чтобы $\sigma_{\text{отн}} = 1\%$. Для этого n должно быть не менее 10 000 ($\frac{100\%}{\sqrt{n}} = 1\%$). Это означает, что при однократном счете с вероятностью 68,3% истинное значение числа импульсов равно $10\,000 \pm 100$. Для получения более высокой точности надо набрать больше импульсов, и, наоборот, меньшее число импульсов дает худшую точность. Следовательно, если мы хотим, чтобы все образцы серии были просчитаны с одинаковой точностью, нужно набрать одинаковое число импульсов.

6.4. Преимущества применения радиоактивной метки

Основное преимущество методов с применением радиоизотопных меток перед другими физическими и химическими методами — их *чувствительность*. Например, удельная радиоактивность чистого трития около $50 \text{ Ки} \cdot \text{мМ}^{-1}$, и этот изотоп можно разбавлять в 10^{12} раз, не опасаясь, что радиоактивность не удастся обнаружить. Применение радиоактивных меток позволяет обнаруживать вещества, присутствующие в клетках в таких малых количествах, когда любой чувствительный химический метод здесь бессилён. Другое преимущество радиоактивных меток состоит в том, что их можно вводить в живой организм и проводить исследования с их помощью на уровне интактного организма, что очень выделяет этот метод среди других.

Несмотря на перечисленные преимущества, метод с применением радиоактивной метки, как и всякий метод, имеет некоторые огра-

ничения. Во-первых, хотя меченые соединения участвуют в тех же биохимических реакциях, что и соответствующие немеченые, скорость таких реакций с участием изотопов может быть другой, чем для обычных соединений. Это так называемый *изотопный эффект*. Различия в скоростях химических реакций пропорциональны разности масс изотопов. Так, самая большая разница — у изотопов водорода ^1H и ^3H , меньше у ^{12}C и ^{14}C и совсем незначительна у ^{31}P и ^{32}P . Во-вторых, количество изотопа в исследуемом объекте должно бы быть минимально необходимым для хорошей регистрации, иначе излучение может сказаться на организме, нарушить его функционирование, а следовательно, привести к неверным результатам. И, наконец, следует иметь в виду, что при введении соединения уровень его в организме становится выше нормального; поэтому к получаемым результатам всегда надо относиться критически.

6.5. Применение радиоизотопов в биологических исследованиях

Ниже рассмотрена область применения радиоизотопов в биологии. Поскольку число возможных приложений очень велико, а экспериментальные детали довольно сложны, мы даем просто краткий обзор этих приложений.

6.5.1. Исследование путей метаболизма

Радиоизотопы часто применяются для выяснения путей метаболизма различных соединений. Эти исследования обычно проводят по следующей схеме. Сначала добавляют меченое соединение, затем в различные моменты времени извлекают пробы, экстрагируют из них продукты и проводят их хроматографический анализ. Радиоактивность определяют либо сканированием хроматограмм счетчиком Гейгера, либо автордиографически, выдерживая хроматограммы в контакте с рентгеновской пленкой в течение некоторого времени. Идентифицировав меченые соединения, определив в каждом из них радиоактивность, построив соответствующие графики, можно получить информацию о реакциях, участвующих в метаболизме.

С использованием радиоактивных соединений можно проверить ту или иную гипотезу о путях метаболизма соединений. Например, можно предсказать судьбу отдельных атомов углерода ^{14}C -ацетата в цикле трикарбоновых кислот. Были разработаны методы выделения промежуточных продуктов цикла, которые позволили получить данные по распределению углерода в каждом промежуточном продукте. Этот способ называется *специфическим мечением*. Совпаде-

ние полученных данных с предполагаемой моделью является доказательством правильности модели.

Другой пример применения радиоизотопов — установление последовательности работы ферментов при окислении глюкозы. Существует несколько возможных путей окисления глюкозы. В аэробных организмах их два: гликолиз с циклом трикарбоновых кислот и пентозо-фосфатный. Зачастую в организме и соответствующих тканях присутствуют ферменты для обоих типов метаболизма, и интересно выяснить роль каждого из них. Оба пути приводят к полному окислению глюкозы до двуокиси углерода, но шесть атомов углерода глюкозы принимают участие в ее образовании в разной степени (по крайней мере на начальных стадиях превращения экзогенно добавленного субстрата). Поэтому можно выявить двуокись углерода, образовавшуюся при окислении специфически меченой глюкозы (например, ^{14}C -глюкозы, в которой радиоактивный изотоп ^{14}C содержит только C_6 -атом глюкозы), и выяснить участие каждого из метаболических путей в процессе окисления.

Применение радиоизотопов в исследовании цикла трикарбоновых кислот или путей катаболизма глюкозы — это примеры, иллюстрирующие роль радиоизотопов в таких исследованиях. Другие подобные примеры и описание соответствующих экспериментов можно найти в рекомендуемой в разд. 6.8 литературе.

6.5.2. Использование радиоизотопов в исследовании поглощения и переноса веществ

Радиоизотопы широко применяются в исследовании механизмов и скорости *поглощения* и *переноса* органических и неорганических соединений животными и растениями. Такие опыты просты в исполнении и являются прямым способом выяснить пути переноса и места усвоения биологически важных молекул.

6.5.3. Применение радиоизотопов для определения скорости обмена

С помощью радиоизотопов очень удобно определять скорость обмена соединений. Для примера рассмотрим превращение белков у крыс. Нескольким крысам вводят меченые аминокислоты и выжидают 24 ч; за это время большинство из них включается в состав белков. Затем через определенные интервалы времени крыс умерщвляют и определяют радиоактивность соответствующих органов и тканей. Оказалось, что белки печени обновляются через 7—14 сут, кожи и мышц — за 8—12 нед, а коллаген обновляется менее чем на 10% за год.

6.5.4. Использование радиоизотопов в клинике

Радиоизотопы широко применяются в медицине, особенно для диагностических целей. Работа легких исследуется в основном при помощи ^{133}Xe , который применяется для диагноза причины их неправильного функционирования. При диагностике заболеваний почек применяется ^{131}I -иодгиппуровая кислота. Функцию щитовидной железы — гипо- и гипертиреозидизма — исследуют при помощи ^{131}I .

Радиоизотопы используются и в гематологии. Сюда входит измерение времени жизни клеток крови, объема крови и времени ее циркуляции, т. е. все те параметры, которые необходимы в клинических исследованиях.

6.5.5. Использование радиоизотопов в фармакологии

Другая область, где радиоизотопы также очень широко применяются, — это получение новых лекарственных средств. Само получение лекарств — очень сложный процесс, поскольку, кроме получения желаемого терапевтического эффекта, надо провести много исследований, прежде чем начнется клиническое испытание препарата. Например, необходимо определить место и скорость усвоения препарата, скорость метаболизма, а также исследовать все продукты метаболизма. В любом из этих испытаний применение радиоизотопов — большое подспорье, а иногда они просто незаменимы. Например, автордиография полного разреза экспериментального животного (разд. 1.4) дает информацию о месте и скорости усвоения препарата, а стандартные методы метаболического анализа — о скорости метаболизма и его продуктах.

6.5.6. Метод изотопного разбавления

В организмах существует много соединений, определить которые обычными методами не удастся, поскольку они присутствуют в крайне малых количествах, да еще в смеси с аналогичными соединениями. В таких случаях незаменимым становится *метод изотопного разбавления*; его преимущество состоит еще и в том, что такой анализ не требует выделения препарата в ощутимых количествах. Пусть, например, требуется определить содержание железа в препарате белка, а обычные методы по тем или иным причинам применить не удастся. В таком случае можно воспользоваться радиоактивным изотопом ^{59}Fe . Его смешивают с белком, затем выделяют железо, определяют его общее количество и радиоактивность.

Если удельная активность введенного железа была $10\,000 \text{ расп.} \times \times \text{мин}^{-1}$ на 10 мг, а удельная активность выделенного препарата

железа составила $9000 \text{ расп.} \cdot \text{мин}^{-1}$ на 10 мг, то их разница обусловлена железом (x), содержавшимся в белке, т. е.

$$\frac{9000}{10} = \frac{10\,000}{10 + x},$$

откуда $x = 1,1 \text{ мг.}$

Этот метод широко применяется, например, для определения следовых количеств элементов.

6.5.7. Определение возраста по радиоактивности

Еще одно интересное применение радиоизотопов — определение с их помощью возраста камней, окаменелостей и осадочных пород. В этом методе предполагается, что содержание в образце элемента, содержащего радиоактивный изотоп, в течение всего времени постоянно. При отвердевании и осаждении породы в ней начинает распадаться изотоп. Определив количество оставшегося радиоизотопа (или же измерив количество продукта распада) и зная время полураспада, можно определить возраст образца. Пусть, например, известно, что радиоизотоп обычно составляет 1% элемента, а в исследуемом образце его содержание равно 0,25%; следовательно, со времени осаждения прошло два периода полураспада. Если период полураспада $T_{1/2} = 1 \text{ млн. лет}$, то образец образовался 2 млн. лет назад.

Для определения возраста более старых образцов надо измерять содержание очень долгоживущих изотопов — ^{235}U , ^{238}U и ^{40}K ; для молодых образцов используется ^{14}C . Вряд ли стоит лишний раз подчеркивать, что допущения, используемые при определении возраста по радиоактивности, довольно произвольные и данные получаются с большим разбросом; следовательно, палеонтологи и антропологи, пользующиеся этим методом, определяют возраст довольно приближенно.

6.5.8. Использование радиоизотопов в экологических исследованиях

Работы с радиоактивной меткой проводятся в основном в биохимических, клинических и фармакологических лабораториях, однако радиоактивные элементы используются также экологами. Особенно удобно при помощи метки исследовать миграцию и поведение животных. Другое применение этой методики в экологии — исследование пищевых сетей, когда используют радиоактивные продукты, а затем прослеживают всевозможные пути меченого соединения.

6.5.9. Применение радиоизотопов для стерилизации пищи и оборудования

Мощные γ -источники широко применяются в настоящее время для стерилизации упакованных продуктов пищевой промышленности (молоко, мясо). Обычно это ^{60}Co и ^{137}Cs . Стерилизацию надо проводить осторожно, чтобы не повредить сам продукт, поэтому часто дозу радиации уменьшают, так что продукт стерилизуется не полностью, но зато практически не портится.

^{60}Co и ^{137}Cs применяются также для стерилизации мелкого пластмассового оборудования (чашки Петри, шприцы и т. д.) и препаратов для инъекции.

6.5.10. Использование радиоизотопов в качестве мутагенов

Радиоизотопы вызывают мутации, особенно в микроорганизмах. При помощи радиоизотопов можно получать микробиологические мутанты с полезными свойствами, например, из радиационных мутантов получают микроорганизмы, которые продуцируют в большом количестве необходимый продукт.

6.6. Вопросы техники безопасности

Никакая глава о радиоизотопах не может считаться полной, если в ней не освещены вопросы техники безопасности при работе с изотопами. Радиация опасна, но если тщательно соблюдать меры предосторожности, то опасностей не больше, чем при работе с не-радиоактивными химическими веществами. Рекомендации по технике безопасности при работе с радиоизотопами выработаны и опубликованы в виде Code of Practice: Ionising Radiations in Research and Training, H.M.S.O.

Следует иметь в виду, что во всех случаях для работы с радиоактивностью надо получать специальное разрешение. В таком разрешении указывается максимальное количество радиоактивности, с которым можно работать в указанном помещении. Разработаны санитарные требования, предусматривающие ограничения для количества выбрасываемых вместе с твердым мусором и в канализацию вместе с жидкостью радиоактивных отходов. Хранение, использование и распределение радиоактивных изотопов периодически контролируют санитарные дозиметрические службы.

Предосторожности, которые необходимо соблюдать при работе с радиоактивностью, определяются типом радиоизотопов, но есть и некоторые общие правила безопасности. Например, вся работа с радиоактивностью должна проводиться над подносом, накрытым специальной адсорбирующей бумагой; необходимо работать в рези-

новых перчатках, в специальной одежде и ни в коем случае не отсасывать жидкость в пипетку ртом. В помещении, где ведется работа с радиоактивностью, категорически запрещается принимать пищу, пользоваться косметикой и курить. Все порезы и ссадины на коже обязательно заклеивать водонепроницаемым пластырем. Надо быть очень внимательным к случайно пролитым радиоактивным растворам и сразу же ликвидировать все радиоактивные загрязнения. Это относится также и к попаданию радиоактивности на кожу и одежду.

6.7. Заключение

В этой главе мы рассмотрели теоретические основы радиоактивности, ее регистрацию, количественное определение, а также применение радиоизотопов в биологии. Область их применения чрезвычайно широка, а данные, полученные при помощи радиоизотопов в последние десятилетия, внесли немалый вклад в понимание жизненно важных процессов. Вряд ли стоит говорить, что и в будущих исследованиях радиоизотопы будут играть не меньшую роль; поэтому все начинающие работать в биологии должны обладать прочными теоретическими знаниями и иметь практические навыки работы с радиоактивностью.

6.8. Рекомендуемая литература

- Aronoff S.*, *Techniques in Radiobiochemistry*. Iowa State University Press, 1958. (Обширный обзор по применению радиоизотопов в биохимии.)
- Dawes E. A.*, *Quantitative Problems in Biochemistry*, 5th edn. E & S. Livingstone, Edinburgh, 1972. (Рассмотрены количественные аспекты применения радиоактивных меток; содержит большое число задач.)
- Oliver R.*, *Principles of the use of Radioisotope Tracers in Clinical and Research Investigations*. Pergamon Press, Oxford, 1971. (Рассмотрены вопросы применения меченых соединений в клинике и влияния излучения на человека.)
- Wang C. H., Willis D. L.*, *Radiotracer Methodology in Biological Sciences*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1965. (Наиболее обширная и доступная книга по теоретическим и практическим вопросам радиоактивности.)

Дополнительная литература

- Аронов М. А.*, *Изотопы в медицине и биологии*, Медгиз, М., 1961.

ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИЕ, ЭЛЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ И ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

7.1. Введение

Потенциометрические методы основаны на измерении э.д.с., создаваемой *электрохимическим элементом*. Простейший электрохимический элемент состоит из двух соединенных проводником металлических электродов, погруженных в разные растворы. Цепь между растворами замыкается с помощью агарового мостика (агар, приготовленный на растворе KCl ; рис. 7.1). Растворы содержат легко окисляемые или восстанавливаемые соединения. Электроны переходят с металла на такое легко восстанавливаемое вещество, металл заряжается положительно, и это приводит к возникновению между металлом и раствором разности потенциалов (окислительно-восстановительный потенциал). Металлический электрод является составной частью электрической цепи, поэтому при наличии второго электрода, погруженного в раствор, содержащий менее легко восстанавливаемое или окисляемое соединение, в цепи возникает ток.

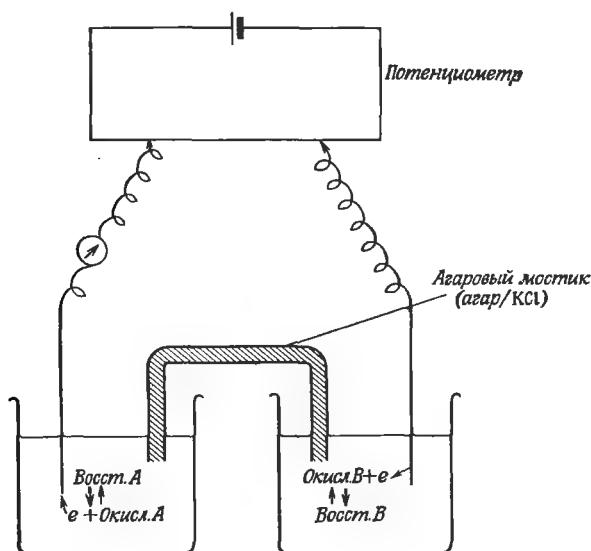


Рис. 7.1. Схема потенциометрической цепи для измерения э.д.с. электрохимического элемента.

Каждый металлический электрод вместе с раствором, в который он погружен, составляет *полуэлемент*. Измерить разность потенциалов изолированного полуэлемента невозможно; для этого он должен быть связан со вторым полуэлементом, потенциал которого принимается за начало отсчета. В качестве такого стандарта берут полуэлемент с водородным электродом, однако из-за трудности работы с ним на практике вместо водородного электрода зачастую применяют так называемые *электроды сравнения*.

Некоторые содержащиеся внутри клетки соединения — цитохромы, хиноны, ферредоксины и нуклеотиды — могут существовать как в окисленной, так и в восстановленной форме. Потенциометрическое определение окислительно-восстановительных потенциалов, обусловленных этими соединениями, может помочь в выяснении механизма и путей переноса электронов в митохондриях и хлоропластах.

Некоторые виды полуэлементов, применяемые в биохимической практике, такие, как стеклянные электроды для измерения рН и электроды с избирательной проницаемостью для различных ионов (ион-селективные), создают разность потенциалов, которую обычно нельзя измерить потенциометрически. У стеклянного электрода, например, сопротивление может достигать тысячи миллионов ом, и его разность потенциалов лучше всего измерять с помощью одного или нескольких ламповых электрометров (разд. 7.4.1).

Окислительно-восстановительные потенциалы можно определить и с помощью полярографических методов, хотя эта методика в принципе отличается от описанной выше. При полярографии не измеряют э.д.с., производимую электрохимической ячейкой, а наоборот, прикладывают напряжение к системе и измеряют результирующую силу тока. Полярография в биохимической практике применяется в основном не для измерения окислительно-восстановительных потенциалов, а для качественного и количественного анализа различных веществ.

Как окислительно-восстановительные потенциалы, так и рН можно оценить с помощью красителей-индикаторов. Важно, чтобы каждый из этих красителей обладал чувствительностью либо к рН, либо к изменению окислительно-восстановительного потенциала, но не к тому и другому одновременно, однако зачастую это требование невыполнимо.

7.2. Стандартный водородный электрод

При использовании водородного электрода в качестве стандартного полуэлемента принимают создаваемый им при заданных условиях потенциал равным нулю. Принято, что *потенциал обратимого водородного электрода при парциальном давлении газообраз-*

ного водорода 1 атм, находящегося в равновесии с раствором ионов водорода при их активности, равной единице, имеет нулевое значение при любой температуре.

Электрод состоит из устойчивого к коррозии металлического стержня (например, платина, покрытая платиновой чернью), погруженного в раствор соляной кислоты в концентрации 1,228 М; через раствор вокруг электрода пропускается газообразный водород под давлением 1 атм. В результате равновесия, устанавливающегося между газообразным водородом и ионами водорода, на электроде возникает стандартный потенциал, который принимается за нуль.

Подобный электрод можно использовать для определения концентрации водородных ионов, если погрузить его в раствор с неизвестным рН. В этом случае в цепь включают какой-либо электрод с постоянным потенциалом; получаемая э.д.с. зависит от рН раствора.

С применением водородного электрода связано много технических трудностей. Газообразный водород должен быть высокоочищенным, свободным от кислорода и подаваться под постоянным давлением. Платиновая чернь легко отравляется не только кислородом, но и другими веществами, например белками. Это ограничивает применение водородного электрода даже в качестве стандартного, а при измерении рН возникает еще больше сложностей из-за химических реакций между газообразным водородом и компонентами исследуемого раствора. Вследствие этого для измерения рН обычно применяют другие электроды.

7.3. Электроды сравнения

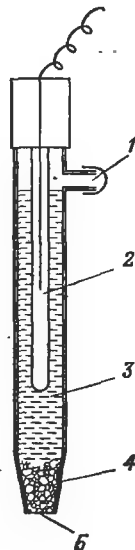
В лабораторной практике электроды сравнения применяются гораздо шире, чем водородные. Величину возникающего на них устойчивого потенциала предварительно определяют по сравнению со стандартным водородным электродом. Как правило, контакт электрода сравнения с испытуемым раствором осуществляется через агаровый мостик (агар, приготовленный на растворе KCl). К сожалению, при этом возникает так называемая контактная разность потенциалов, величина которой неизвестна.

Очень важно следить за тем, чтобы хлористый калий диффундировал в наружный раствор медленно, поскольку он может загрязнять образец. В тех случаях, когда целью работы является измерение концентрации калия или хлора с помощью ион-селективных электродов, необходимо проводить специальный контроль.

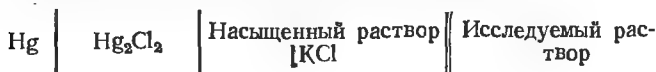
Наиболее распространенными электродами сравнения являются каломельные электроды (рис. 7.2); они образованы раствором хлористой ртути (каломели) и хлористого калия, находящимся в кон-

Рис. 7.2. Каломельный электрод.

1 — отверстие для заполнения электрода KCl; 2 — паста из ртути и хлористой ртути; 3 — насыщенный раствор KCl; 4 — кристаллы KCl; 5 — пористая мембрана.



такте с твердой хлористой ртутью и ртутью. Эту часть цепи можно представить в следующем вид:



Двойная вертикальная черта указывает на наличие солевого мостика. У стеклянных рН-электродов в качестве внутреннего электрода сравнения вместо каломельного применяют хлорсеребряный электрод, в котором имеется стержень из металлического серебра, покрытый хлористым серебром, в растворе, содержащем ионы хлора (обычно соляную кислоту)



7.4. Измерение рН

! Электрометрические и потенциометрические методы. Для определения концентрации водородных ионов применяются электроды трех типов — водородный, хингидронный и стеклянный. Водородный электрод в принципе может быть использован для измерения рН, но, как мы уже говорили в разд. 7.2, в большинстве случаев для практической работы не пригоден. При его применении во избежание ошибок необходимо, чтобы раствор, рН которого нужно определить, не содержал окисляющих агентов или солей металлов. Хингидронный электрод менее чувствителен к солям металлов, однако его нельзя использовать при работе с растворами, содержащими окисляющие и восстанавливающие агенты. Область применения хингидронного электрода ограничивается значением рН не более 8,5, так как в щелочной среде хингидрон (эквимоллярная смесь хинона и гидрохинона) окисляется и диссоциирует с образованием ионов водорода. Получаемые значения рН могут быть искажены за счет ионной силы среды. Хингидронный электрод состоит из инертного полированного металла (например, платины), погруженного в испытуемый раствор, в который добавлен хингидрон.

Наиболее удобен для измерения рН стеклянный электрод, который в значительно меньшей степени подвержен различным не-

желательным влияниям и может применяться в широком интервале рН. При высоких рН точность измерений уменьшается, электрод становится чувствительным к ионам натрия; это один из немногих недостатков данной методики.

7.4.1. Стекланный электрод

Некоторые теоретические вопросы. Внутри стеклянного электрода имеется внутренний электрод сравнения, помещенный в раствор со строго фиксированным рН. Рабочая часть электрода, погружаемая в раствор с неизвестным рН, представляет собой тонкостенный шарик (рис. 7.3). Полуэлемент с помощью солевого мостика связан с наружным электродом сравнения.

Внутренний электрод сравнения в растворе (Ag/AgCl в 0,1 М HCl)	Стекланная мембрана	Раствор с неизвест- ным рН	Насыщенный раствор KCl (соле- вой мостик)	Электрод сравнения (каломель)
--	------------------------	----------------------------------	--	-------------------------------------

Потенциал стеклянного электрода E является суммой трех компонентов:

- 1) потенциала внутреннего электрода сравнения,
- 2) потенциала асимметрии,

3) потенциала, обусловленного различиями в концентрации ионов водорода по обе стороны стеклянной перегородки (мембраны).

Потенциал внутреннего электрода сравнения является величиной постоянной. Потенциал асимметрии также должен быть постоянным для данного электрода; его можно измерить, сделав рН растворов по обе стороны мембраны одинаковыми. Возможно, этот потенциал обусловлен напряжениями в стекле, которое представляет собой сверхохлажденную жидкость. Потенциал асимметрии может измениться, если электрод высохнет. Потенциал, обусловленный различиями в концентрации водородных ионов по обе стороны мембраны, по-видимому, возникает за счет переноса ионов водорода через сте-

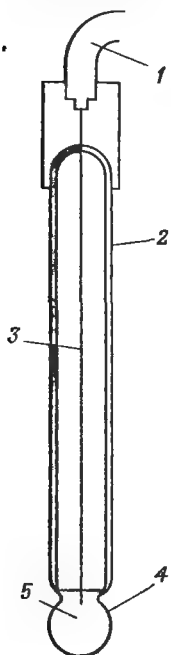


Рис. 7.3. Стеклянный электрод.

1 — соединительный провод; 2 — стеклянный сосуд; 3 — внутренний электрод; 4 — тонкостенный стеклянный шарик; 5 — 0,1 М раствор HCl.

кло или за счет ионного обмена (окончательной теории по этому вопросу пока нет).

$$E = E_{\text{сравн}} + E_{\text{асимм}} + 0,059(\text{pH}_x - \text{pH}_c) \quad \text{при } 25^\circ\text{C},$$

где E — измеряемый потенциал стеклянного электрода, $E_{\text{сравн}}$ — потенциал внутреннего электрода сравнения, $E_{\text{асимм}}$ — потенциал асимметрии, pH_c — pH раствора внутри стеклянного электрода (const), pH_x — pH неизвестного раствора.

Следовательно,

$$E = E_{\text{пост}} + 0,059 \text{pH}_x,$$

откуда

$$\text{pH}_x = \frac{E - E_{\text{пост}}}{0,059}.$$

На измерение pH путем определения э.д.с. влияет температура. Частично температурный эффект учитывают с помощью уравнения

$$E = E^0 - \frac{2,303 RT}{F} \text{pH},$$

где R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура, F — число Фарадея, E — измеряемый потенциал, E^0 — стандартный потенциал.

Большинство pH -метров снабжены приспособлениями для компенсации температурных эффектов, но «нулевой сдвиг», обусловленный изменением величины E^0 , обычно не компенсируется. Он имеет место, когда температура электрода и измеряемого раствора не соответствует той, при которой проводилась настройка по буферному раствору. Иногда температура влияет и непосредственно на pH раствора. Это относится в первую очередь к щелочным растворам. Буфер, имеющий, например, при 20°C значение pH 8,0, при 0°C может иметь несколько другой pH , и это всегда следует иметь в виду при выполнении очень точных измерений.

Прибор для измерения pH . Применяемое для измерения pH оборудование состоит из стеклянного электрода, электрода сравнения с солевым мостиком (разд. 7.3) и pH -метра. Иногда фирменные электроды включают в себя одновременно и стеклянный электрод, и «наружный» электрод сравнения, как показано на рис. 7.4.

Конструкция стеклянного электрода изображена на рис. 7.3. На конце стеклянной трубки электрода имеется тонкостенный шарик, сделанный из «мягкого» натриевого стекла с низкой точкой плавления. Толщина его стенок всего 0,005 см, поэтому обращаясь со стеклянным электродом нужно очень осторожно, так как его легко повредить. Электрический контакт с внутренней стороной мембраны осуществляется через раствор, в который погру-

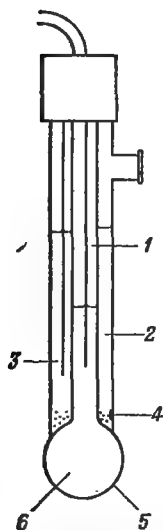


Рис. 7.4. Комбинированный электрод, состоящий из электрода сравнения и стеклянного электрода.

1 — внутренний электрод (Ag/AgCl); 2 — солевой мостик; 3 — «внутренний» электрод сравнения; 4 — жидкий контакт; 5 — стеклянная мембрана; 6 — 0,1 М HCl .

жен внутренний хлорсеребряный электрод сравнения. Иногда в качестве внутреннего электрода сравнения применяют платиновый электрод, погруженный в 0,1 М раствор соляной кислоты, насыщенный гидрохиноном.

Э.д.с., создаваемую элементом, состоящим из стеклянного электрода и электрода сравнения, необходимо регистрировать приборами, обладающими высоким сопротивлением, т. е. потребляющими незначительный ток в системе: большая сила тока вызывала бы

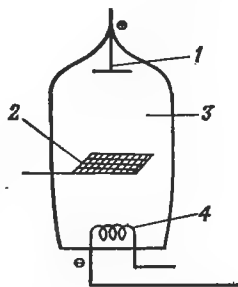
изменения в концентрации ионов, а следовательно, и рН. Требуемыми качествами обладают применяемые при рН-метрии ламповые электрометры (рис. 7.5). В триоде электроны, перемещаясь от катода к аноду, создают ток, сила которого существенно зависит от потенциала сетки. Разность потенциалов может быть определена путем подключения к катоду и сетке лампы. Лампу либо включают в схему, непосредственно регистрирующую потенциал, либо используют в качестве нуль-индикатора. Последний способ точнее, однако требует некоторых навыков, и изменение потенциала в этом случае нельзя регистрировать непрерывно.

Для специальных измерений рН существует модифицированное оборудование; например, имеются приборы, предназначенные для измерения рН крови, рН в различных участках ротовой полости, рН тканей и содержимого желудка. Обычные стеклянные электроды не годятся для измерений в сильно щелочных средах; для этих целей необходимы мембраны из специального стекла, содержащего щелочноземельные металлы или литий. Такого рода стеклянные электроды сохраняют линейную зависимость измеряемого потенциала от концентрации водородных ионов вплоть до рН 13. К счастью, в биологических исследованиях эта область, как правило, не представляет практического интереса. Для микробиологов очень удобны стеклянные электроды, которые можно стерилизовать паром. В полевых условиях пользуются портативным оборудованием, состоящим из рН-метра и электродов.

Ход работы. Новые или высохшие электроды перед работой необходимо вымочить в течение нескольких часов при рН 7 в воде или буферном растворе. Рекомендуются также активировать элект-

Рис. 7.5. Триод.

1 — анод; 2 — сетка; 3 — вакуум; 4 — катод (раскаленная проволока).



роды выдерживанием их от 12 до 24 ч в 0,1 М растворе HCl, однако эта процедура не обязательна. Electroды следует держать в дистиллированной воде, поскольку высушивание их приводит к изменению потенциала асимметрии, что требует частой калибровки прибора. Повторное вымачивание, как правило, восстанавливает электрод почти до нормального состояния, однако вследствие высыхания поверхность электродов изнашивается.

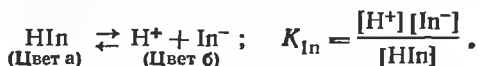
Для калибровки прибора необходимо иметь два буфера с разными рН. Исследуемый и стандартные буферные растворы должны иметь одну и ту же температуру; ручку температурной компенсации необходимо установить в соответствующее положение. Стекланный электрод (и внешний электрод сравнения, если он смонтирован отдельно) погружают в буферный раствор, осторожно перемешиваемый для приведения системы в равновесие, и прибор настраивают в соответствии с известным значением рН. Затем электроды вынимают из раствора и отмывают их дистиллированной водой. После этого электроды погружают в другой буферный раствор; показания рН-метра должны соответствовать рН этого второго раствора. Отсутствие такого соответствия указывает на нарушения изоляции или повреждения электрода (трещины или царапины в мембране).

Стекланный электрод с успехом применяется для измерения рН растворов, содержащих соли металлов, окисляющие или восстанавливающие агенты, так как посторонние воздействия не влияют на его показания. Стекланный электрод нельзя использовать для точных измерений рН выше 9 или 10 (за исключением электродов специальной конструкции), а также в растворах с низкой концентрацией воды. Можно применять стекланный электрод для измерения рН растворов, содержащих белок, и желатиноподобных растворов, однако нужно следить, чтобы эти растворы не высыхали на поверхности мембраны: образующаяся при этом пленка будет ухудшать реакцию электрода.

7.4.2. рН-индикаторы

Точное измерение рН обычно проводят с помощью стеклнного электрода, однако в некоторых случаях, например при кислотно-основном титровании, можно применять рН-индикаторы.

Индикаторы представляют собой слабые кислоты или основания, у которых диссоциированная и недиссоциированная формы имеют разную окраску. В большинстве случаев окрашены обе формы (так, бромкрезоловый зеленый меняет окраску с желтой на синюю при защелачивании раствора), однако, например, раствор фенолфталеина при рН ниже 8,3 бесцветен, а при добавлении щелочи становится малиновым. Изменение окраски каждого индикатора происходит в узком диапазоне рН, в пределах двух единиц рН. В этом диапазоне окраска раствора промежуточная между окрасками диссоциированной и недиссоциированной форм. Диссоциацию рН-индикатора, являющегося слабой кислотой, можно описать следующим уравнением:



Добавление кислоты подавляет ионизацию (реакция сдвигается влево), а добавление щелочи, равносильное удалению протона, сдвигает реакцию вправо. К этой системе применимо уравнение Гендерсона—Хассельбальха (разд. 1.2.3)

$$\text{pH} = \text{p}K_{\text{In}} + \lg \frac{[\text{In}^-]}{[\text{HIn}]},$$

где $\text{p}K_{\text{In}} = -\lg K_{\text{In}}$.

Если, к примеру, рН исследуемого раствора равно 4, нужно применять индикатор с $\text{p}K_{\text{In}}$ около 4, так как при этом значении рН в растворе будет содержаться одинаковое количество диссоциированной и недиссоциированной форм, что обусловит промежуточную окраску индикатора.

Для титрования сильной кислоты и сильной щелочи требуется один из индикаторов, меняющих окраску в пределах рН от 5 до 9, так как одной капли титрующего раствора оказывается достаточно, чтобы вызвать изменение рН такого порядка. Следовательно, набор индикаторов, пригодных для данного случая, достаточно широк. При титровании слабой кислоты сильной щелочью конечная точка титрования лежит при рН около 8, и для ее определения подходит такой индикатор, как фенолфталеин. Конечная точка титрования сильной кислоты слабой щелочью сдвинута в кислую сторону, и подходящим для такого случая индикатором является метилоранж. Когда и кислота и щелочь слабые, конечная точка титрования соответствует рН 7, но она трудно уловима, и ее определение лучше проводить с помощью рН-метра.

В табл. 7.1 дается список наиболее распространенных индикаторов и перечень их свойств. Всего существует несколько сотен рН-индикаторов, но не все они надежны.

Неизвестное значение рН раствора определяют, сравнивая окраску смеси индикатор—раствор с окраской соответствующего

Таблица 7.1

рН-индикаторы

Индикатор	Область рН	Цвет в кислоте	Цвет в щелочи
Тимоловый синий (кислый)	1,2—2,8	Красный	Желтый
Метилоранж	3,1—4,4	Красный	Желтый
Бромкрезоловый зеленый	3,8—5,4	Желтый	Синий
Метиловый красный	4,3—6,3	Красный	Желтый
Лакмус	5,0—8,0	Красный	Синий
Бромкрезоловый фиолетовый	5,2—6,8	Желтый	Фиолетовый
Бромтимоловый синий	6,0—7,6	Желтый	Синий
Нейтральный красный	6,8—8,0	Красный	Оранжевый
Феноловый красный	6,8—8,4	Желтый	Красный
Крезоловый красный (основание)	7,2—8,8	Желтый	Красный
Тимоловый синий (основание) . . .	8,0—9,6	Желтый	Синий
Фенолфталеин	8,2—10,0	Бесцветный	Красный

контроля. Для этой цели используют различные окрашенные стекла, цветные таблицы или серии стандартных буферов с индикаторами. Для обеспечения достаточной точности определения рН с помощью индикаторов необходимо предпринять ряд мер. Концентрация индикатора, например, должна быть как можно более низкой, так как диссоциация слабой кислоты или слабого основания, каковыми являются индикаторы, может сама по себе привести к изменению рН. Эту погрешность можно уменьшить, снижая концентрацию индикатора; при этом чем интенсивнее присущая ему окраска, тем меньше может быть концентрация. Для определения рН без буферного раствора вместо индикаторов нужно пользоваться стеклянным электродом.

К сожалению, видимая окраска индикатора меняется в зависимости от условий определения, например температуры или ионной силы растворов. Для некоторых красителей характерен дихроизм; бромкрезоловый фиолетовый кажется фиолетовым в разбавленном растворе, но в толще раствора или при повышении концентрации выглядит красным. Интенсивность окраски может зависеть от присутствия спирта, причем в одних случаях чувствительность метода повышается, а в других — снижается.

В ряде случаев метод измерения рН с помощью красителей непригоден. Таким способом, например, очень трудно измерить рН ярко окрашенных растворов. Совершенно очевидно также, что если между индикатором и исследуемым раствором идет химическая реакция, для измерения рН последнего необходимо пользоваться стеклянным электродом. Исследование белковых растворов также лучше проводить с помощью стеклянного электрода, потому что индикатор взаимодействует со многими заряженными группами

белка. Коллоидные растворы часто адсорбируют индикаторы, и для определения рН таких растворов применяют иные методы.

Каждый индикатор в отдельности пригоден для работы только в узком интервале рН. Если же возникает необходимость найти примерное значение рН неизвестного раствора или следить за изменениями рН в широком диапазоне, используют смесь индикаторов. Набор универсальных индикаторов охватывает область рН от 3 до 11. Существуют также индикаторные бумаги; одни из них предназначены для широкого интервала значений рН, другие — для узкого. У индикаторных бумаг те же преимущества и недостатки, что и у растворов индикаторов, например они также непригодны для измерения рН сильно окрашенных растворов, а некоторые из них избирательно адсорбируют из растворов определенные вещества.

Приборы, основывающиеся на применении индикаторов, в настоящее время широко не используются. Одним из таких приборов является, например, компаратор, при помощи которого наблюдатель сравнивает окраску индикатора в исследуемом растворе с набором окрашенных стекол. Сопоставление и оценка проводятся в компараторе визуально; точность метода не превышает 0,1 единицы рН.

Можно пользоваться также «методом клина», при котором раствор неионизованной формы индикатора наливают в один клиновидный отсек кюветы, а ионизованной — в другой. Наблюдатель видит слева окраску, присущую одной из форм индикатора, а справа — другой. Поскольку клинья перекрывают друг друга, окраска в середине является промежуточной между двумя вышеупомянутыми и зависит от толщины клиньев. Значение рН определяют, сопоставляя окраску в разных частях кюветы с окраской неизвестного раствора. В настоящее время все чаще применяют индикаторы в сочетании со спектрофотометрией.

7.4.3. рН-стат

рН-стат представляет собой разновидность автоматического титратора, который используется для поддержания постоянства рН в ходе реакции, связанной с высвобождением или поглощением протонов. По кривой автоматической регистрации расхода добавляемого реагента во времени можно определить скорость реакции. Необходимым для этого оборудованием являются: стеклянный электрод, рН-метр, самописец, регулятор и бюретка. Можно применять обычные бюретки, снабженные магнитным клапаном, однако лучше для этой цели подходит бюретка-шприц с автоматическим приводом. Регулятор нужен для отключения тока в электрической цепи автоматического привода при достижении конечной точки титрования. В усовершенствованных моделях автоматиче-

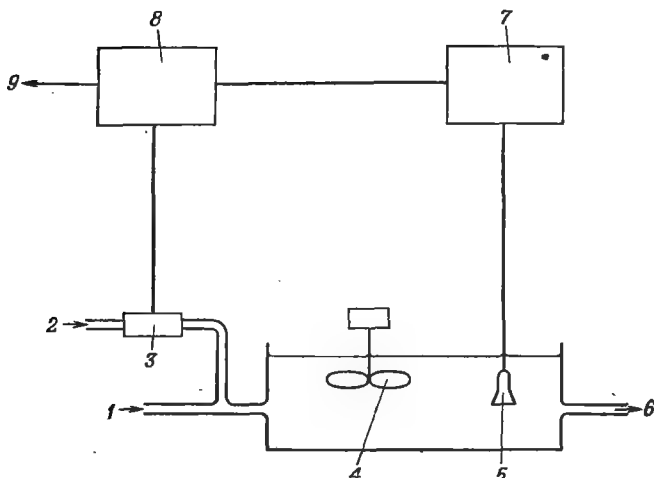


Рис. 7.6. Установка для автоматического контроля за pH.

1 — исходный раствор; 2 — реагент; 3 — клапан; 4 — мешалка; 5 — электрод; 6 — раствор с доведенным pH; 7 — усилитель; 8 — регулятор; 9 — к самописцу.

ских титраторов количество добавляемого реагента по мере приближения к конечной точке титрования уменьшается, что позволяет избежать «перетитровывания» раствора. Стекланные pH-электроды, используемые в кинетических исследованиях, должны быть очень точными и давать стабильные показания. Реакционный сосуд с раствором, в который погружены стекланный электрод и каломельный электрод сравнения, необходимо термостатировать.

Применимость данного метода несколько ограничена по ряду причин. Например, раствор в реакционном сосуде необходимо непрерывно перемешивать, а это может вызывать денатурацию белка и дополнительное растворение двуокиси углерода в реакционной смеси. Другие трудности — это существование неизвестного контактного потенциала и подтекание жидкости из кончика бюретки, находящегося под поверхностью раствора. Подтекание можно уменьшить, если плотность жидкости, вытекающей из бюретки, сделать ниже плотности реакционной смеси.

Основное применение pH-статы находят в области ферментативной кинетики, особенно при изучении протеолитических ферментов. С помощью pH-статов изучают процессы гидролиза пептидов и нуклеиновых кислот. Их можно использовать в бактериологических исследованиях и на производстве. На рис. 7.6 схематически представлена установка, применяющаяся в производственных масштабах.

7.4.4. Чувствительные рН-метры для кинетических исследований

Основная трудность, возникающая при работе с рН-статом, связана с необходимостью интенсивного перемешивания раствора, которое может денатурировать белок. Кроме того, у системы существует постоянная времени, и для некоторых кинетических экспериментов она может оказаться слишком большой. По этой причине для точной регистрации небольших изменений рН применяют чувствительные рН-метры. При этом отпадает необходимость и в титровании кислотой или щелочью, и в перемешивании в ходе реакции. Вмонтированную в прибор магнитную мешалку можно выключить в ходе эксперимента. Изменение рН за все время проведения опыта настолько незначительно, что не сказывается на скорости реакции. В сущности шкала рН при этом утрачивает свое значение, и прибор должен быть проградуирован в мВ. Чувствительность метода зависит от постоянной времени усилителя и самописца, а также от буферной емкости образца и среды. При достаточно низкой концентрации буфера некоторые приборы способны зарегистрировать сдвиг на всю шкалу при появлении всего лишь 0,1 мкмольа ионов водорода. При использовании чувствительных рН-метров можно измерять значения начальной скорости реакции с точностью до нескольких секунд.

7.5. Ион-селективные электроды

Стеклянный электрод по сути дела является ион-селективным, поскольку он чувствителен к ионам водорода. В настоящее время имеются электроды, чувствительные и к другим ионам, например, Cl^- , Na^+ . Их лучше называть ион-селективными, а не ион-специфическими, так как зачастую эти электроды способны реагировать и на другие ионы. В паспортах электродов приводятся данные о их специфичности и возможных посторонних воздействиях. Многие из этих воздействий, к счастью, не имеют практической значимости. Например, хотя Zn^{2+} взаимодействует с Ca^{2+} -электродом, при биологических исследованиях это, как правило, не играет роли. В некоторых случаях нет необходимости готовить образец каким-то специальным образом, но все-таки результаты получаются точнее, если добавляют реагенты для доведения рН или устранения мешающих ионов. Если исследуются пробы с сильно различающимися ионными силами, в них рекомендуется добавлять «уравниватель» ионной силы.

Одни ионы определяют непосредственно с помощью электродов; другие — косвенным путем, с помощью титрования. Некоторые ионы, например ионы хлора, можно обнаружить с помощью элект-

родов, разных по принципу действия. Как и при работе со стеклянными электродами, в качестве внешних электродов сравнения используются каломельные, но, как правило, специальной конструкции. Так, чтобы избежать загрязнения образца хлористым калием, применяют электрод сравнения с двойным электролитическим мостиком.

Стеклянные ион-селективные электроды. Эти электроды по принципу действия и конструкции подобны рН-электродам, но отличаются от них по составу стеклянной мембраны. Примером такого рода является натриевый электрод. Если обычный рН-электрод чувствителен к ионам натрия только в щелочных условиях, то натриевый — в широком диапазоне значений рН. Однако стеклянные электроды нечувствительны к анионам и двухвалентным катионам, для их измерения существуют другие типы электродов.

Жидкостные ионообменные электроды. Эти электроды, называемые также жидкостными мембранными электродами, содержат жидкий органический ионообменник и тонкую пористую мембрану, обладающую сродством к органическим соединениям. При взаимодействии с этой мембраной аниона или катиона возникает потенциал. Оборудование также включает в себя внутренний электрод сравнения с Ag/AgCl . К таким ионообменным электродам относится кальциевый электрод.

Твердые электроды. В этих электродах вместо стеклянной мембраны применяют кристалл. Например, во фторидном электроде используют кристалл фторида лантана. В сочетании с внешним электродом сравнения такие электроды называют комбинированными.

Действие большинства электродов основано на одном из вышеупомянутых принципов, но сами электроды могут быть модифицированы и приспособлены для определенных целей. Проточный электрод позволяет промерять образцы анаэробно; существуют электроды для обнаружения газа, растворенного в водных пробах.

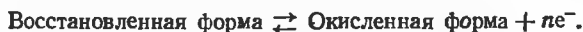
Применение ион-селективных электродов. Определение концентрации ионов представляет интерес для биохимиков, медиков, работников сельского хозяйства и промышленности, поэтому область применения ион-селективных электродов очень широка. Одно из преимуществ этих электродов заключается в том, что исследуемый образец в процессе анализа не расходуется и практически не изменяется, а точные результаты могут быть получены достаточно быстро. В самых разных областях применяется натриевый электрод: при изучении морской воды, сыворотки крови, кожи, почвы. С помощью различных электродов следят за загрязнением воздуха, определяют уровень кальция в крови, а хлоридный электрод применяют для диагностики кистозного фиброза — заболевания, при котором пот содержит избыток хлора.

Ход работы с ион-селективными электродами. Установка, со-

стоящая из ион-селективного электрода, электрода сравнения и соответствующего измерительного прибора, регистрирует потенциал при различных концентрациях ионов. В полулогарифмическом масштабе, когда по оси абсцисс откладывается логарифм концентрации иона, эта зависимость должна представлять собой прямую линию. Затем прибор калибруют по двум известным концентрациям иона и снимают прямые показания измерительного прибора при погружении электрода в раствор с неизвестной концентрацией. Иногда неизвестную концентрацию определяют, регистрируя изменение электродного потенциала по мере разведения образца. Для обработки результатов можно использовать специальную графическую бумагу с полулогарифмическим масштабом.

7.6. Окислительно-восстановительные потенциалы

Окислительно-восстановительной называют реакцию типа



Смесь восстановленной и окисленной форм вещества называется *окислительно-восстановительной парой*. Если погрузить в раствор такой пары какой-нибудь инертный электрод (например, платиновый), металл будет заряжаться (разд. 7.1), между электродом и раствором возникнет разность потенциалов. Соединив этот полужелемент с каким-либо электродом сравнения, можно измерить э.д.с. всей цепи с помощью потенциометра (разд. 7.1 и 7.2). В качестве электрода сравнения используют водородный электрод. Окислительно-восстановительные пары имеют положительные или отрицательные окислительно-восстановительные потенциалы в зависимости от того, являются ли они окисляющими или восстанавливающими по отношению к стандартному водородному электроду. Измеряемая э.д.с. зависит от соотношения окисленной и восстановленной форм и от pH и практически не зависит от их истинных концентраций. Ниже приведены используемые в этой методике обозначения; все величины измеряют обычно при 25° С. E_h — измеряемый потенциал пары произвольного, но известного состава (например, смесь с концентрацией окисленной и восстановленной форм 0,03 М и 0,1 М соответственно при pH 6); E_0 — окислительно-восстановительный потенциал пары с концентрацией компонентов 1 М при pH 0; E^0 — E_0 при единичной активности компонентов; E' соответствует E^0 при отличных от 0 pH и, если специально не оговорено, pH принимается равным 7. E_h связан с E^0 следующим уравнением:

$$E_h = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Окисл}]}{[\text{Восст}]},$$

где n — число электронов, переносимых в расчете на одну молекулу, F — число Фарадея, T — абсолютная температура, R — универсальная газовая постоянная.

Наиболее часто в биологических экспериментах пользуются величиной E' ; ее значения для разных систем приведены в табл. 7.2. Теоретически система может быть окислена парой с более положительным, чем у нее самой, E' . Та же система будет окислять пару с более отрицательным E' ; положение равновесия определяется разницей между этими двумя потенциалами.

Таблица 7.2

Значения E' (рН7, 298К)
для некоторых окислительно-восстановительных пар
(с любезного разрешения проф. J. Gareth Morris, 1974).

E' вольты	Пара	"Естественные" переносчики электронов	"Искусственные" переносчики электронов
+0,80	1/2 O ₂ /H ₂ O		
+0,70			
+0,60			
+0,50			
+0,40	Нитрат/Нитрит		Феррицианид/ Ферроцианид
+0,30	1/2 O ₂ /H ₂ O ₂	Цитохром c ₁ Fe ³⁺ /Fe ²⁺ Цитохром c Fe ³⁺ /Fe ²⁺	2,6-Дисхлорбензол-индолин окисл./восст.
+0,20	Кротоновая-КоА/ Бутириловая-КоА	Убихинон окисл./восст.	Феназинметосульфат окисл./восст.
+0,10	Фумарат/Сукцинат	Цитохром b	Метиленовый синий окисл./восст.
0,00		Витамин K ₂ окисл./восст. Рубредоксин окисл./восст. Флавопротеины окисл./восст.	
-0,10		ФАД/ФАД-H ₂	Феносафранин окисл./восст.
-0,20	Пируват/Лактат	Липовая к-та окисл./восст.	Бензилвиологен окисл./восст.
-0,30		НАД ⁺ /НАДН; НАДФ ⁺ /НАДФН	Метилвиологен окисл./восст.
-0,40	H ⁺ /1/2 H ₂	Ферредоксин окисл./восст.	
-0,50			
-0,60	Ацетат/Ацетальдегид		

Изменение свободной энергии реакции можно рассчитать по уравнению

$$\Delta G' = nF \Delta E',$$

где $\Delta G'$ — изменение свободной энергии, $\Delta E'$ — разность потенциалов двух взаимодействующих систем при условии, что число n у них одинаково.

Для живой клетки результат взаимодействия двух окислительно-восстановительных систем с очень близкими E' предсказать трудно, так как это зависит от конкретных условий внутри клетки. Фак-

торами, влияющими на это взаимодействие, являются рН и относительные концентрации компонентов двух данных пар, особенно если один из продуктов устраняется. Это означает, что на практике могут происходить и такие реакции, которые теоретически кажутся маловероятными. При исследовании окислительно-восстановительных реакций следует иметь в виду, что при наличии в среде связывающего данное вещество агента величина E' может искажаться.

Примером окислительно-восстановительных реакций *in vivo* является перенос электронов в хлоропластах и митохондриях. В обоих случаях в системе имеется цепь переносчиков, по которым передаются электроны (и, возможно, ионы водорода). В митохондриях электроны от НАД·Н или сукцината в конечном счете переносятся на кислород, а в хлоропластах существует нециклический процесс передачи электронов от молекулы воды к НАДФ⁺. Каждому из переносчиков, участвующих в этом процессе, присущ свой окислительно-восстановительный потенциал. В митохондриях переносчик с самым отрицательным окислительно-восстановительным потенциалом стоит в цепи первым, а с самым положительным — последним. Электроны передаются по цепи от одного переносчика к другому, и в результате этого процесса энергия запасается в виде АТФ. В хлоропластах процесс передачи осложнен тем, что в двух местах транспортной цепи электрон переходит от соединения с более положительным окислительно-восстановительным потенциалом к соединению с более отрицательным потенциалом; на этих этапах используется энергия солнечного света. Остальные переносчики в цепи располагаются в порядке возрастания их потенциалов, и электроны от предыдущего переносчика к последующему могут переходить самопроизвольно. Суммарный же процесс нуждается в притоке энергии и не может происходить в темноте.

7.6.1. Потенциометрическое титрование окислительно-восстановительных реакций

Окисляя восстановленную форму окислительно-восстановительной пары окисляющим агентом и включив в цепь электрод сравнения, можно определить возникающую при этом разность потенциалов. Зависимость разности потенциалов от процентного содержания окисленной формы представляют графически (рис. 7.7, а). Аналогичным образом, проводя титрование окисленной формы той же самой пары восстанавливающим агентом, получают график зависимости разности потенциалов от процентного содержания восстановленной формы (рис. 7.7, б). Одна из этих кривых является зеркальным отображением другой. Конкретная форма кривой зависит от того, какой переход — одно- или двухэлектронный — имеет место (кривые I — одноэлектронный переход, кривые II — двухэлектронный переход). Иногда два электрона передаются по-

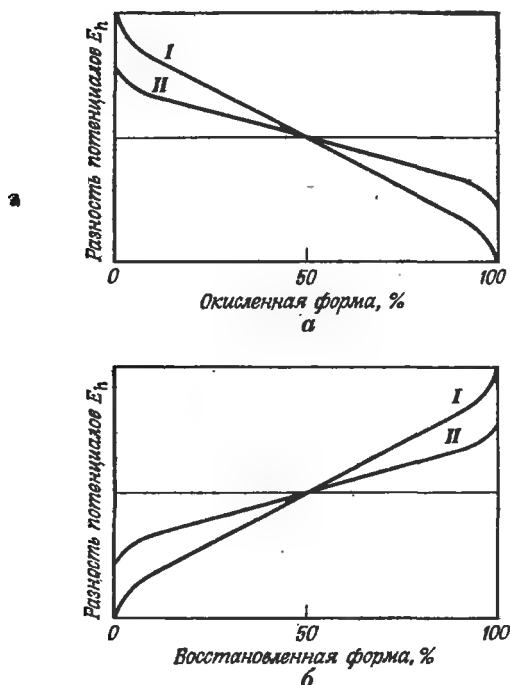


Рис. 7.7. Кривые потенциметрического титрования: окисление восстановленной формы (а) и восстановление окисленной формы (б).

I — одноэлектронный переход; II — двухэлектронный переход.

следовательно, в два этапа. Это относится к хинонам, для которых характерны промежуточные стабильные формы, называемые семихинонами.

Конечная точка окислительно-восстановительного титрования, как правило, обозначается резким скачком электродного потенциала (разности потенциалов). Если, например, титровать сульфат железа перманганатом калия в разбавленной серной кислоте, то вплоть до полного окисления соли окислительно-восстановительный потенциал будет возрастать медленно, а затем последует скачок. При изучении окислительно-восстановительных процессов в биологических системах часто пользуются методикой, при которой образец помещают в буфер, содержащий заданную смесь ферро- и феррицианидов калия. Нередко процентное содержание восстановленной формы в образце, например для цитохромов, определяют спектроскопическими методами, что, строго говоря, не является титрованием.

7.6.2. Окислительно-восстановительные индикаторы

Большинство таких индикаторов ярко окрашены в окисленном состоянии и бесцветны в восстановленном (хотя имеются и исключения, такие как соли тетразолия и виологены). Эти индикаторы можно применять для определения окислительно-восстановительного потенциала отдельного раствора, а также использовать в качестве доноров или акцепторов электронов, причем в этом случае можно следить за скоростью реакции окисления или восстановления. По скорости восстановления красителя, наблюдая за окраской раствора, определяют также ферментативную активность (например, сукцинатдегидрогеназы). Применение индикаторов дает возможность изучать процессы переноса электронов в хлоропластах, митохондриях, бактериальных и дрожжевых клетках и даже в тканевых срезах и гомогенатах. Для определения степени окисленности или восстановленности обычно применяют спектрофотометрические методы, хотя можно следить и за поглощением или выделением газа, если оно имеет место в процессе реакции.

Если акцептор электронов после его восстановления вновь легко окисляется (например, метиленовый синий), измерения необходимо проводить в анаэробных условиях, иначе снова появится исходная окраска. Это удобно делать в пробирках Тунберга. Каждый отдельный краситель можно использовать только в узком диапазоне значений окислительных потенциалов. Так, уменьшение степени окисленности от 99% до 1% в одноэлектронной системе вызывает изменение потенциала на 0,24 В, а в двухэлектронной — всего на 0,12 В. Подбирая соответствующие сочетания красителей, можно, однако, расширить область измерений.

Желательно, чтобы окраска индикатора не зависела от изменения рН, но это далеко не всегда возможно. рН оказывает заметное влияние на окислительно-восстановительные потенциалы пар, у которых ионы водорода являются участниками реакции. Следовательно, необходимо указывать рН, при котором получена величина E_h .

Полученные результаты необходимо трактовать с осторожностью, поскольку красители могут влиять на происходящие реакции, а также ингибировать ферменты или отравлять микроорганизмы. Важно учитывать и проницаемость — краситель может не попасть в ту часть клетки, где протекает ферментативная реакция.

Применимость красителя в качестве искусственного донора или акцептора электронов зависит от скорости, с которой он взаимодействует с соответствующими компонентами биологической системы, и от степени специфичности этого взаимодействия. К сожалению, многие красители не являются высокоспецифичными и могут отдавать или принимать электроны в нескольких звеньях цепи переноса в зависимости от условий (например, концентрации красителя).

В таких случаях иногда применяют эти соединения в сочетании с ингибиторами, что позволяет изолированно изучать одно из звеньев цепи. При этом электроны искусственно вводятся в какое-либо одно место цепи и искусственно удаляются из нее в другом месте.

С помощью красителей удастся определить внутриклеточную локализацию и активность какого-либо фермента на специально подготовленных тканевых срезах (гистохимическое окрашивание). Чаще всего применяют различного рода соли тетразолия, так как продукт восстановления (формазан) представляет собой нерастворимое ярко окрашенное соединение и местоположение осадка указывает на участок ферментативной активности. Ферменты, прочно связанные с мембранами (такие, как сукцинатдегидрогеназа), обнаружить легко, но растворимые ферменты могут диффундировать из тканевых срезов, если не предпринять специальных мер. Для предотвращения диффузии срезы предварительно обрабатывают поливиниловым спиртом, что удерживает ферменты внутри ткани. Количественные данные по ферментативной активности можно получить с помощью микроденситометрии или элюировав формазан и определив его количество спектроскопически. Ферментативную активность рассчитывают по отношению к объему среза или, лучше, к азоту белка.

Свойства отдельных искусственных переносчиков электронов. Метилвиологен ($E' = -0,45$ В) и бензилвиологен ($E' = -0,36$ В) применяются для выявления систем с ярко выраженными восстанавливающими свойствами. Они могут восстанавливаться фотосистемой I хлоропластов, но не фотосистемой II. Восстановленная форма легко окисляется на воздухе (автоокисление), поэтому опыты следует проводить в анаэробных условиях.

Тетразолиевые красители растворимы в воде и практически бесцветны, но при восстановлении большинство из них дает интенсивное красное окрашивание, обусловленное образованием формазана. Поскольку восстановление необратимо, эксперименты можно проводить на воздухе. К сожалению, способность к восстановлению сильно зависит от рН. При низких рН восстановление идет плохо, и может образоваться бесцветный продукт, зато в щелочных условиях восстановление может быть спонтанным. Участок митохондриальной цепи переноса электронов, с которого акцептирует электроны тетразолиевая соль, а также легкость, с которой происходит восстановление, зависят от того, какая именно тетразолиевая соль применяется. Из солей этого рода чаще всего используют хлористый 2,3,5-трифенилтетразолий ($E' = -0,08$ В). Для количественных определений выпавший в осадок формазан растворяют в органическом растворителе и измеряют интенсивность окраски.

Метиленовый синий ($E' = +0,01$ В) также применяется для определения скорости переноса электронов, однако пользоваться

им неудобно, поскольку краситель самоокисляется, и эксперименты нужно проводить анаэробно. То же самое справедливо и для феназинметосульфата (ФМС, $E' = +0,08$ В). Скорость ферментативной реакции, определяемая с помощью ФМС, сильно зависит от концентрации красителя. При очень высоких концентрациях краситель может оказывать ингибирующее действие. Другая трудность связана со светочувствительностью красителя, а также с не очень высокой его специфичностью — по-видимому, ФМС может взаимодействовать с двумя участками цепи переноса электронов в митохондриях.

2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИ, $E' = +0,22$ В) подвержен самоокислению лишь в незначительной степени и удобен в том отношении, что эксперименты с ним можно проводить аэробно, однако окраска его зависит от рН. При рН 4 и ниже это соединение имеет красный цвет, а при более высоких значениях рН — синий. Данный краситель применяется в основном для работы с хлоропластами при изучении реакции Хилла. Хлоропласты суспендируют в подходящей среде, добавляют ДХФИ и раствор освещают. При высвобождении электронов из молекул воды образуется кислород, а электроны по цепи переноса передаются на краситель, который восстанавливается и становится бесцветным. Скорость переноса электронов в хлоропластах определяют спектроскопически, наблюдая за ходом восстановления красителя.

Феррицианид калия ($E' = +0,36$ В) применяется для изучения переноса электронов как в митохондриях, так и в хлоропластах, а также для определения активности изолированных дегидрогеназ. Он взаимодействует с дыхательной цепью митохондрий в двух участках.

Искусственные доноры электронов. Восстановленная форма окислительно-восстановительной пары может выступать в качестве донора электронов. Так, например, в хлоропластах ионы марганца (пара Mn^{2+}/Mn^{3+}) могут окисляться, заменяя тем самым воду. В качестве искусственного донора электронов наиболее широко применяется аскорбиновая кислота, обычно в смеси с другими веществами. Например, при работе с хлоропластами было показано, что в фотосистеме II аскорбиновая кислота в чистом виде или в смеси с фенилендиамином может подвергаться окислению вместо воды. Та же аскорбиновая кислота в сочетании с ДХФИ является донором электронов для фотосистемы I. При работе с митохондриями аскорбиновую кислоту часто применяют в сочетании с цитохромом *c* или с N,N,N',N' -тетраметил-*p*-фенилендиамином (ТМФД): в обоих случаях электроны передаются на цитохром *c*.

7.7. Полярография

Полярографический метод основан на автоматической регистрации силы тока при постепенном увеличении напряжения на электродах, погруженных в исследуемый раствор. По определению одним из этих электродов является *капельный ртутный электрод*. Более общим описательным названием данного метода является термин «вольтаметрия»; в этом случае имеется в виду, что запись показаний силы тока и напряжения может осуществляться вручную, а вместо капельного ртутного электрода применяется платиновый.

Полярография представляет собой чрезвычайно чувствительный метод, позволяющий работать с очень разбавленными растворами и небольшими объемами. С помощью полярографии можно выявить наличие того или иного вещества в препарате (например, витаминов, гормонов, аминокислот) и определить его истинную концентрацию. (Иногда, правда, вещество необходимо соответствующим образом обработать). Метод позволяет получить данные по окислению и восстановлению даже в том случае, когда этого не удастся сделать никаким другим способом. С помощью полярографии изучают как быстрые, так и медленные реакции, ее широко используют и при работе с ферментами (например, каталазой и пероксидазой). Метод находит также применение в клинике, в том числе при диагностике раковых заболеваний.

Основной недостаток полярографии заключается в том, что для интерпретации получаемых результатов требуется значительный опыт, кроме того, побочные эффекты довольно часты и не всегда легко устранимы. В связи с этим полярографический метод не слишком широко применяется в биохимических лабораториях, и для проведения подобного рода исследований зачастую пользуются более удобными методами.

На рис. 7.8 представлен простой прибор для записи полярограмм вручную. Капельный ртутный электрод состоит из резервуара со ртутью, переходящего вниз в длинную трубку с капилляром на конце, из которого ртуть капает в исследуемый раствор. Вес столбика ртути подбирается таким образом, чтобы капли ртути образовывались с нужной скоростью; размер капель определяется диаметром капиллярной трубки. (Нужно принять меры предосторожности, чтобы избежать вдыхания паров ртути). Капельный ртутный электрод обычно (но не всегда) является катодом, а слой ртути на дне сосуда с раствором (рис. 7.8) играет роль анода. В усовершенствованных моделях этот слой заменен каломельным электродом, соединенным с раствором солевым мостиком.

Изменение разности потенциалов между электродами осуществляется с помощью потенциометра. Сила возникающего при этом тока измеряется гальванометром. Исследуемый раствор не должен со-

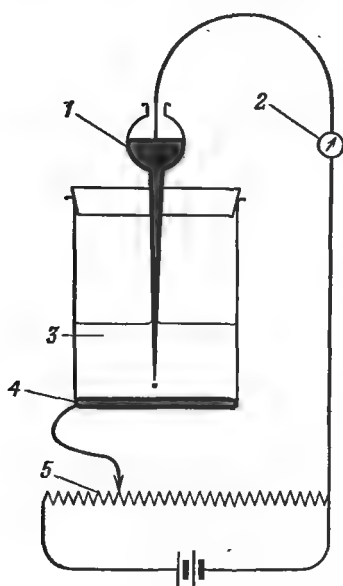


Рис. 7.8. Простейшая полярографическая цепь.

1 — капельный ртутный электрод; 2 — гальванометр; 3 — исследуемый раствор; 4 — ртутный анод; 5 — потенциометр.

держат кислорода, который может восстанавливаться электролитически и искажать результаты. Поэтому перед началом работы через раствор пропускают какой-либо инертный газ, например азот, а затем изолируют раствор от атмосферы. В этих экспериментах капельный ртутный электрод является рабочим (или индикаторным). Он способен «поляризоваться» (сила тока по мере достижения этим электродом прилагаемого к нему потенциала если и возрастает, то

очень незначительно). Поверхность электрода в результате образования ртутных капель постоянно обновляется, и поэтому продукты реакции его не загрязняют. Второй электрод не поляризует.

Получаемая зависимость силы тока от напряжения называется полярограммой (рис. 7.9); она может состоять из серии волн. В начале сила тока очень мала и по мере роста напряжения не возрастает, поскольку происходит зарядка капельного ртутного электрода. Увеличение потенциала до значения, при котором происходит восстановление иона, приводит к тому, что в этой области небольшое возрастание напряжения сопровождается значительным увеличением силы тока («волна»). Потенциал полуволны ($E_{1/2}$) является величиной, характерной для данного соединения, и может быть использован для его идентификации. При дальнейшем увеличении напряжения сила тока достигает некоторой постоянной величины, так как все ионы, достигающие электрода, сразу же восстанавливаются. Это так называемый предельный ток, определяемый скоростью диффузии, которая прямо пропорциональна концентрации. Таким образом, после предварительной калибровки прибора с помощью стандартных растворов по высоте волны можно определить концентрацию вещества. Если потенциал продолжает возрастать до такой величины, при которой начинается восстановление другой разновидности ионов, возникает новая волна. По ходу записи на полярограмме часто возникают небольшие коле-

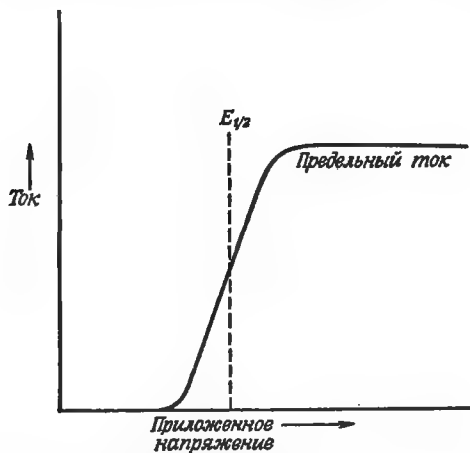


Рис. 7.9. Типичная полярограмма восстановления катнона.

бания, обусловленные изменением поверхности капли ртути, висющей на конце капиллярной трубки.

Описываемые здесь волны представляют собой «диффузионные волны» и бывают катодными (при восстановлении) или анодными (при окислении). Для изучения восстановительных процессов наиболее удобен капельный ртутный электрод, а при окислении менее легко окисляемых соединений пользуются вращающимся платиновым электродом или угольным электродом. Другой разновидностью волны является «кинетическая волна», при которой сила тока определяется химической реакцией, происходящей на электроде. Этот фактор используется для изучения некоторых ферментативных реакций. Белки и полипептиды, содержащие цистин, сам цистин и сыворотку крови можно исследовать с помощью реакции, известной как реакция Брэдичка.

Полярографические волны характерны для тех веществ, которые могут окисляться или восстанавливаться на капельном ртутном электроде, образовывать соли со ртутью или являются поверхностно-активными. Это, с одной стороны, означает, что данным методом можно изучать самые разные вещества, а с другой — что могут возникать помехи, искажающие результаты. Вещества с близкими значениями потенциалов полуволны дают перекрывающиеся кривые. В связи с этим иногда заменяют электролит или перед полярографией проводят хроматографическое разделение веществ. Измерения обычно проводят в водных растворах при концентрациях около 10^{-4} М, и, следовательно, исследуемые вещества должны быть достаточно хорошо растворимы.

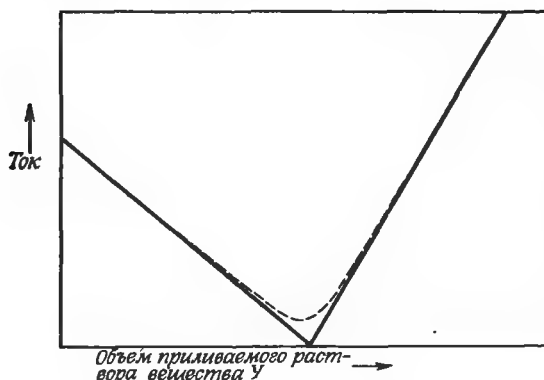


Рис. 7.10. Амперометрическое титрование.
Вещество X титруется веществом Y ; продукт XU нерастворим.

7.7.1. Амперометрическое титрование

Термин *амперометрическое* указывает на то, что в этой методике регистрируют изменение силы тока (ранее применяли термин *полярометрическое титрование*). По графику зависимости силы тока от количества титрующего вещества определяют конечную точку титрования. Применяемый для этого прибор может, как и в полярографии, иметь один индикаторный электрод, но иногда применяют два электрода. Лучше использовать капельный ртутный электрод, но можно работать и с платиновым или серебряным.

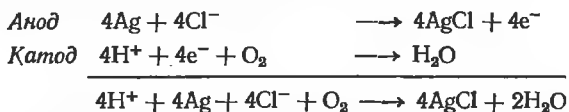
Примером амперометрического титрования является титрование вещества X веществом Y , когда оба они растворимы и обуславливают возникновение тока при определенном напряжении, а взаимодействуя, дают нерастворимое соединение XU . Общий вид получающейся при этом зависимости представлен на рис. 7.10. Пунктирная линия соответствует одной из возможных экспериментальных кривых, а сплошная представляет собой зависимость, которую можно получить лишь в идеальных условиях. При эквивалентных количествах веществ X и Y сила тока очень незначительна, так как вследствие образования соединения XU в растворе остается очень мало свободных X и Y , обуславливающих ток. Примером амперометрического титрования в биологии является титрование SH-групп белков тиоловыми реагентами, содержащими тяжелые металлы.



Рис. 7.11. Элемент, образованный кислородным электродом и исследуемым раствором.

7.8. Кислородный электрод

Принцип действия. Измерение содержания кислорода с помощью электродов основывается на вольтаметрии и полярографии. При электролитическом восстановлении кислорода образуется полярографическая волна, по которой и определяют его содержание. Для этих целей можно пользоваться капельным ртутным электродом, но чаще применяют платиновый. Обычно приложенное напряжение поддерживают постоянным и измеряют силу тока, которая зависит от концентрации кислорода. Когда платиновый или золотой электроды используют в сочетании с хлорсеребряным анодом (рис. 7.11), на аноде образуется четыре электрона, которые на катоде идут на восстановление молекулы кислорода.:



Если напряжение на электродах составляет (0,5—0,8) В, то сила тока, возникающего при этом, прямо пропорциональна концентрации кислорода в растворе.

7.8.1. Типы кислородных электродов

Кислородные электроды очень разнообразны по конструкции, однако используются в основном три вида.

Открытый электрод состоит из платиновой или золотой проволоки, непосредственно погруженной в реакционную смесь. В некоторых конструкциях чувствительность увеличивают за счет использования колеблющихся или вращающихся электродов. Такие электроды особенно полезны для измерения очень быстрых изменений концентрации кислорода в процессе ферментативных реакций. Однако открытые электроды легко отравляются такими веществами, как феррицианид, цианид, аскорбиновая кислота и индофеноловые красители, которые часто применяются в экспериментах по изучению процессов дыхания.

Закрытый микроэлектрод состоит из платиновой проволоки, запаянной в стекло или эпоксидную смолу, так что в контакте с ис-

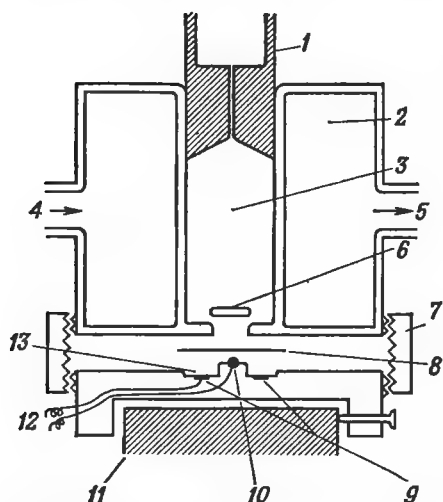


Рис. 7.12. Электрод Рэнка (поперечное сечение).

1 — пробка; 2 — термостатирующая рубашка; 3 — реакционный сосуд; 4 — ввод воды; 5 — вывод воды; 6 — мешалка; 7 — фланец; 8 — тефлоновая мембрана; 9 — кольцеобразный серебряный анод; 10 — платиновый катод; 11 — основание магнитной мешалки; 12 — к батарее и самописцу; 13 — раствор KCl.

следующим раствором, который помещают в воронкообразное углубление в конце стеклянного или эпоксидного чехла, находится только самый кончик проволоки. Поскольку открытая поверхность электрода мала, поглощение им кислорода невелико, но вследствие особенностей конструкции ячейки электрод пригоден только для измерения фиксированных количеств кислорода (например, в крови или плазме).

Электрод Кларка состоит из платинового катода и серебряного анода, погруженных в один и тот же раствор концентрированного хлористого калия и отделенных от исследуемого раствора мембраной. Этот электрод применяется для изучения биохимических реакций наиболее широко, поскольку мембрана (которая обычно изготавливается из политетрафторэтилена, например тефлона) защищает электроды от загрязнения химическими реагентами, содержащимися в исследуемом растворе, и, таким образом, устраняет один из недостатков, свойственных открытому электроду. Наличие мембраны, правда, увеличивает постоянную времени прибора. Существует много разновидностей электрода Кларка; к числу наиболее распространенных относится электрод Рэнка (рис. 7.12).

7.8.2. Работа с электродом Рэнка

Раствор насыщенного или 1 М хлористого калия наливают таким образом, чтобы покрыть серебряный и платиновый электроды. Над платиновым электродом на подложке с небольшим отверстием помещают полторасантиметровый квадратный кусочек тефлона толщиной 12 мкм, который затем фиксируется реакционным сосудом. При этой операции следует обратить внимание, чтобы мембрана не перекрутилась и под нее не попали пузырьки воздуха. Затем в термостатированный реакционный сосуд с магнитной мешалкой с помощью пипетки наливают буферный раствор, предварительно

выдержанный несколько часов при температуре реакции. При закрывании сосуда пробкой нужно следить, чтобы весь воздух из сосуда вышел. После заполнения сосуда включают мешалку. Буфер используют для установления самописца прибора на 100% насыщения кислородом. Значение для 0% кислорода получают добавлением к буферу небольших количеств дитионита натрия или вытеснением кислорода из буферного раствора азотом. Затем вместо буфера наливают исследуемый раствор и другие необходимые растворы, также предварительно выдержанные при температуре опыта для установления равновесия, и с помощью самописца непосредственно регистрируют изменения содержания кислорода. В ходе эксперимента в реакционную смесь можно через пробку внести шприцем небольшие добавки. После каждого опыта аппарат необходимо тщательно промывать, так как многие химические реагенты адсорбируются мембраной и стенками сосуда. Особую осторожность нужно соблюдать в том случае, когда в реакционной смеси имеются органические растворители.

7.8.3. Применение кислородного электрода

Кислородный электрод используют для исследования реакций, сопровождающихся выделением или поглощением кислорода. Эксперимент, как правило, занимает не более часа. Иногда, правда, проводят длительные исследования, например наблюдение за уровнем содержания кислорода в процессе роста микроорганизмов. Для работы такого рода необходимы приборы несколько иной конструкции. Менее продолжительными являются опыты по определению активности ферментов и исследования на митохондриях и хлоропластах.

Исследования на митохондриях. Изучение дыхательного контроля, а также исследование действия различных ингибиторов на дыхание митохондрий и измерение отношения АДФ/О (количество молекул АДФ, перешедших в АТФ, в расчете на один атом потребленного кислорода) лучше всего проводить с помощью кислородного электрода. Если митохондрии выделить в очень тщательно контролируемых условиях и суспендировать в изотонической среде, содержащей фосфат и субстрат, то значительное поглощение кислорода будет происходить только в присутствии АДФ. О таких митохондриях говорят, что они «прочно сопряженные» и находятся в состоянии 3 (активном). Когда весь АДФ израсходован, скорость дыхания возвращается к исходному низкому уровню — состоянию 4 (неактивному). Отношение скорости дыхания в присутствии АДФ к скорости дыхания после того, как весь АДФ перешел в АТФ, известно под названием *дыхательный контроль*. Это отношение является мерой сопряжения дыхания и фосфорилирования. Высокое значение дыхательного контроля характерно для интакт-



Рис. 7.13. Запись поглощения кислорода для интактных митохондрий.

ных митохондрий, а низкое — для поврежденных, «разобленных» митохондрий, которые поглощают кислород без добавления АДФ. Интактные митохондрии можно «разобшить» такими реагентами, как 2,4-динитрофенол. Типичный пример записи поглощения кислорода интактными митохондриями приведен на рис. 7.13. Кислородный электрод применяется для измерения отношения АДФ/О, что численно эквивалентно отношению Р/О. Теоретическое значение отношения Р/О для «прочно сопряженных» митохондрий при окислении таких субстратов, как малат и α -кетоглутарат, где в роли кофермента выступает НАД⁺, равно 3. Для таких субстратов, как сукцинат, окисление которого идет в обход первого участка фосфорилирования, это отношение равно 2. На практике получаемые экспериментально значения Р/О всегда несколько ниже, чем рассчитанные величины, что объясняется частичным разобшением, а также действием мембранных АТФаз.

Исследование на хлоропластах. Применяя специальным образом освещаемый электрод Кларка, можно изучать также выделение кислорода водорослями, хлоропластами и фракциями хлоропластов, обогащенными фотосистемой II. Начальные стадии выделения кислорода при освещении изучают с помощью открытого кислородного электрода; при этом на поверхность электрода наносят тонкий слой хлоропластов и дают короткие вспышки света.

7.9. CO_2 -чувствительный электрод

Конструкция этого электрода не имеет ничего общего с кислородным электродом, а основывается на модификации оборудования для измерений рН. CO_2 -чувствительный электрод состоит из

Рис. 7.14. Принцип действия CO_2 -чувствительного электрода

стеклянного рН-электрода, покрытого насыщенной жидкостью целлофановой мембраной, которая в свою очередь покрыта тонкой резиновой пленкой, проницаемой для двуокиси углерода. Диффундирующая внутрь пленки двуокись углерода приходит в равновесие с тонким слоем электролитической жидкости. При этом происходит изменение рН, которое регистрируется рН-метром (рис. 7.14).

У первых электродов такого рода постоянная времени была довольно большой и, кроме того, зависимость между концентрацией двуокиси углерода и показаниями прибора была логарифмической. Применение силиконовой резиновой мембраны позволило уменьшить постоянную времени, а аналоговый преобразователь дал возможность получить на выходе линейную зависимость. Прибор легко калибруется стандартными растворами бикарбоната или при различном парциальном давлении двуокиси углерода. До настоящего времени этот электрод использовали не так широко, как кислородный, хотя он и применялся в клинической биохимии и физиологии.

7.10. Рекомендуемая литература

- Beechey R. B., Ribbons D. W., Oxygen electrode measurements, in: *Methods in Microbiology*, Vol. 6B. Ed. by Norris J. R. and Ribbons D. W., Academic Press, London, 1972. (Подробно рассмотрены конструкция и применение кислородных электродов.)
- Jacobsen C. F., Léonis J., Linderstrom-Lang K., Ottesen M., The pH-Stat and its use in biochemistry, in: *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 4. Ed. by Glick D., Wiley-Interscience, New York, 1957.
- Lessler M. A., Brierley G. P., Oxygen electrode measurements in biochemical analysis, in: *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 17. Ed. by Glick D., Wiley-Interscience, New York, 1969. (Общие сведения о применении кислородных электродов в практической биохимии.)
- Mattock G., pH Measurements and Titration (Physical Processes in the Chemical Industry, Vol. VI), Heywood, London, 1961. (Принципиальная основа и практические аспекты измерения рН и титрования.)
- Morris J. G., A Biologist's Physical Chemistry, 2nd ed., Contemporary Biology Series, Edward Arnold, London, 1974. (Детально рассмотрены вопросы окисления и восстановления.)

- Nicholls D. G., Garland P. B.*, Electrode measurements of carbon dioxide, in: *Methods in Microbiology*, Vol. 6B. Ed. by Norris J. R. and Ribbons D.W., Academic Press, London, 1972.
- Peel J. L.*, The use of electron acceptors, donors and carriers, in: *Methods in Microbiology*, Vol. 6B. Ed. by Norris J. R. and Ribbons D. W., Academic Press, London, 1972. (Особенности применяемых методов и предосторожности, которые необходимо соблюдать при трактовке полученных результатов.)
- Weast R. C.*, Handbook of Chemistry and Physics, 54th edn., The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio, 1974.
- Zuman P.*, Polarography of biomolecules, in: *Experimental Methods in Biophysical Chemistry*. Ed. by Nicholau C. J., Wiley, London, 1973.

Дополнительная литература

- Ионоселективные электроды. Под ред. Р. Дарста, пер. с англ., изд-во «Мир», М., 1972.

Глава 8

МАНОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

8.1. Введение

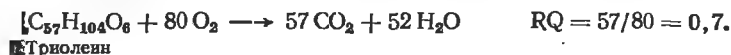
В ходе многих процессов, протекающих в биологических системах, происходит обмен этих систем кислородом и (или) двуокисью углерода с окружающей средой. Измерение скорости и уровня этого обмена дает простой, удобный и чувствительный метод исследования таких систем. В то время как кислородный и CO_2 -чувствительный электроды просто регистрируют изменения в напряжении либо кислорода, либо углекислоты соответственно, манометрические методы могут быть использованы для измерений поглощения или выделения и двуокиси углерода, и кислорода.

Кислородный электрод способен регистрировать меньшие, чем в манометрии, изменения в напряжении кислорода и поэтому особенно ценён при исследовании процессов, протекающих в митохондриях, хлоропластах или с участием таких изолированных ферментов, как моноаминоксидаза. Кроме того, у кислородного электрода меньше постоянная времени и его проще приспособить для непрерывной регистрации изменений концентрации кислорода. Манометрия как метод исследования подходит для тех случаев, когда имеют дело с большими количествами материала, и применяется для изучения клеточных органелл, клеточных суспензий, тканевых срезов и гомогенатов, семян и даже целых насекомых. Манометрия позволяет также непрерывно следить за обменом кислорода и двуокиси углерода, причем величина этого обмена не зависит от парциального давления газа в начале эксперимента. Эти особенности отличают манометрию от методов с применением кислородного электрода и позволяют изучать газообмен в присутствии смесей других газов.

Традиционной единицей для измерения объема газа является микролитр (мкл). Эквивалентная единица в системе СИ — это кубический миллиметр (мм^3), т. е. 10^{-9} м, которой мы и будем пользоваться в данной главе. По соглашению, все объемы выделяемого газа считают положительными, а поглощаемого — отрицательными. Это соглашение имеет особое значение при определении дыхательных коэффициентов. *Дыхательный коэффициент* (respiratory quotient) RQ определяется как отношение объема выделяемого углекислого газа к объему кислорода, поглощаемого при дыхании

$$RQ = \frac{CO_2 \text{ выдел}}{O_2 \text{ поглощ}}$$

При изучении организма, дышащего на эндогенных резервах, RQ дает представление о природе метаболизирующихся субстратов. При полном окислении простого углевода $RQ = 1$, для жиров эта величина в среднем составляет 0,7, а для белков — 0,8.



Экспериментально получаемые величины иногда отличаются от вышеприведенных, поскольку некоторая часть двуокиси углерода включается в клеточный материал, что тем самым приводит к снижению количества выделяемой двуокиси углерода.

Скорость, с которой организм или ткань поглощает кислород или выделяет углекислый газ, характеризуется *метаболическим коэффициентом* (или коэффициентом метаболизма) Q_x , где символ x означает газ, объем которого измеряют. Так, Q_{O_2} определяется как объем кислорода, поглощаемого за 1 ч в расчете на 1 мг сухого веса биологического материала. Иногда расчеты проводятся на 1 мг азота (обычно определяемого методом Кьельдаля), на 1 мг белка или ДНК. В таких случаях Q_x имеет следующую размерность:

$$Q_{O_2} (N) = \text{мм}^3 O_2 \cdot (\text{мг тканевого азота})^{-1} \text{ ч}^{-1}.$$

Метаболические коэффициенты можно определять и в атмосфере газов с различным или переменным составом; тогда к коэффициенту добавляют соответствующий индекс:

$$Q_{CO_2}^N (N) = \text{мм}^3 CO_2 (\text{мг тканевого азота})^{-1} \text{ ч}^{-1} \text{ в атмосфере азота.}$$

Во избежание недоразумений следует указывать знак коэффициента (в зависимости от того, выделяется метаболит или поглощается).

8.2. Виды манометрии

Реакцию проводят в небольшой колбе (сосудике), соединенной с каким-либо манометром, которым определяют изменение количества газа в колбе. Существует три основных типа манометрических методов.

Манометрия при постоянном объеме, когда объем газа в сосудике и температура поддерживаются постоянными, а изменение количества газа определяется по изменению давления. По этому принципу действует манометр Варбурга; это один из наиболее широко применяемых манометрических методов.

Манометрия при постоянном давлении; в этом случае постоянными поддерживаются давление и температура, а изменение количества газа определяется по изменению объема. Дальнейшей модификацией этого манометрического метода является недавно появившийся дифференциальный респирометр Джилсона.

Дифференциальная манометрия, при которой постоянна только температура. Система состоит из колбы, в которой идет процесс, и второй колбы (компенсирующей), соединенных между собой через U-образный манометр. С помощью этой второй колбы, в которой не содержится биологического материала, компенсируют изменения температуры и барометрического давления и таким образом непосредственно определяют изменение количества газа в первой колбе по изменению высоты столбика жидкости в манометре. Результаты, получаемые по этой методике, отличаются большей стабильностью; по этому принципу работает манометр Баркрофта.

8.3. Манометр Варбурга (манометр постоянного объема)

8.3.1. Устройство прибора, принцип его действия и ход работы

Этот манометр состоит из U-образной капиллярной трубки, соединенной у основания с сосудом с манометрической жидкостью. Правое колено манометра соединяется с сосудиком посредством хорошо смазанного стеклянного шлифа, а левое открытое колено сообщается с воздухом. За U-образной трубкой расположена миллиметровая шкала, по которой можно регистрировать изменение уровня жидкости в открытом колене манометра. На правом колене в месте, примерно соответствующем середине шкалы, нанесена точка сравнения, к которой подводят уровень жидкости в правом колене перед тем, как снимать показания. Это гарантирует проведение всех измерений при постоянном объеме (рис. 8.1).

В соответствии с конкретными особенностями изучаемой реакции сосудик может иметь один или несколько боковых отростков. Газовый кран в пробке бокового сосудика и трехходовой кран правого колена манометра позволяют пропускать через колбу азот, кислород, углекислый газ или газовую смесь до начала эксперимента. Колбу погружают в термостатированную водяную баню (допускаемые отклонения $\pm 0,05^\circ\text{C}$).

В продаже имеются аппараты Варбурга самых разных конструкций, некоторые из них позволяют работать одновременно с восемнадцатью манометрами.

Для поддержания равновесия между газом в растворе и газовой фазой сосудик механически встряхивают с частотой 100—120

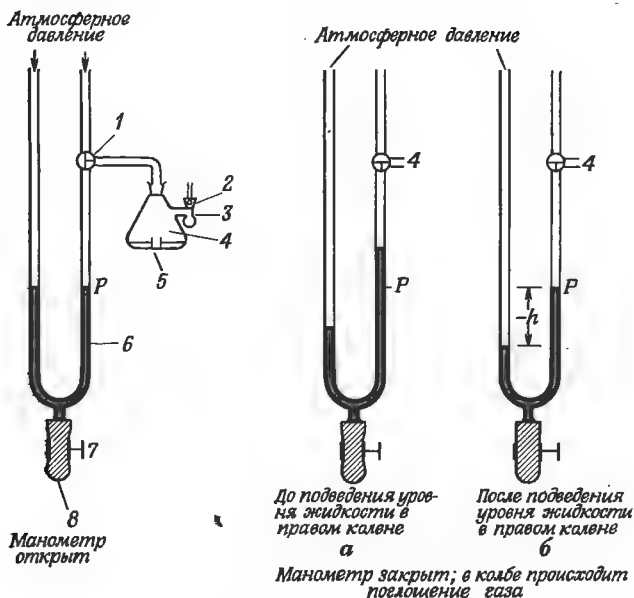


Рис. 8.1. Манометр Варбурга.

В приведенном примере в реакционном сосудике происходит поглощение газа; давление его уменьшается и приводит к подъему уровня жидкости в правом колене манометра и падению в левом. Для измерения результирующего изменения давления в мм столба манометрической жидкости (h) мениск жидкости в правом колене манометра подводят к точке сравнения (P), возвращая жидкость в резервуар с помощью регулировочного винта.

1 — трехходовой кран; 2 — пробка бокового сосудика с газовым краном; 3 — боковой сосудик; 4 — колба; 5 — центральный цилиндр; 6 — манометрическая жидкость известной плотности; 7 — регулировочный винт; 8 — резервуар с манометрической жидкостью.

раз в 1 мин. Это создает уверенность в том, что наблюдаемая скорость газообмена является истинной мерой скорости реакции и не лимитируется диффузией газа из газовой фазы в жидкую. Чтобы окончательно разрешить все сомнения, связанные с диффузией, общий объем жидкости в сосудике рекомендуется ограничивать 4 см³.

В ходе эксперимента уровень жидкости в правом колене манометра регулярно подводят к точке сравнения с помощью регулировочного винта на резервуаре с манометрической жидкостью и затем замеряют уровень жидкости h в левом колене. В большинстве аппаратов Варбурга на все это время приходится прекращать встряхивание всех сосудиков. Такие перерывы во встряхивании могут нарушать равновесие между газовой и жидкой фазами реакционной смеси, поэтому некоторые приборы устроены так, чтобы можно было останавливать только один манометр с сосудиком или даже снимать показания во время встряхивания.

Поскольку жидкость в левом колене манометра сообщается с воздухом, на величине h будет сказываться изменение барометрического давления. Кроме того, h будет зависеть и от незначительного колебания температуры водяной бани. Для устранения обоих источников ошибок применяют *термобарометр*, который представляет собой второй манометр, полностью идентичный первому, за исключением того, что реакционная смесь в нем заменена равным объемом буфера или воды. Любые изменения в уровне жидкости в левом колене этого второго манометра, h^1 , используют для коррекции наблюдаемых изменений h . Если h^1 изменяется в том же направлении, что и h , то h^1 вычитают из h , а если изменения происходят в противоположных направлениях, то h^1 и h складывают. Соответствующий пример дается ниже (разд. 8.6.3).

Можно показать, что изменение уровня манометрической жидкости h связано с количеством X выделившегося или поглощенного газа при с.т.д. следующим уравнением:

$$X = h \left[\frac{V_{\Gamma} \frac{273}{T} + V_{\text{ж}} \alpha}{P_0} \right], \quad (8.1)$$

где V_{Γ} — объем, занимаемый газом, включая объем капилляра от сосуда до точки сравнения (в мм³); $V_{\text{ж}}$ — объем жидкости в сосуде (в мм³); α — растворимость газа (кислорода или двуокиси углерода) в жидкости, находящейся в сосуде; выражается в мм³ газа при с.т.д., растворенного в 1 мм³ жидкости в состоянии равновесия при парциальном давлении P_0 ; T — температура водяной бани в градусах Кельвина; P_0 — стандартное давление, выражаемое в мм манометрической жидкости.

Удельный вес манометрической жидкости обычно доводят до 1,034 г·см⁻³ (используя например, жидкость Броди), так что $P_0 = 10\,000$ мм.

Поскольку для каждого конкретного сосуда и для каждой реакции, протекающей при определенных условиях, все величины, стоящие в скобках в уравнении (8.1), постоянны, мы можем написать

$$X = hk, \quad (8.2)$$

где k — постоянная сосуда.

Таким образом, если k известно, можно без труда пересчитать изменение уровня манометрической жидкости на изменение объема в мм³ при с.т.д.

8.3.2. Калибровка манометров Варбурга

Постоянную сосуда k определяют двумя способами.

Калибровка прямым расчетом по уравнению (8.1). Анализ этого уравнения показывает, что единственным неизвестным в нем

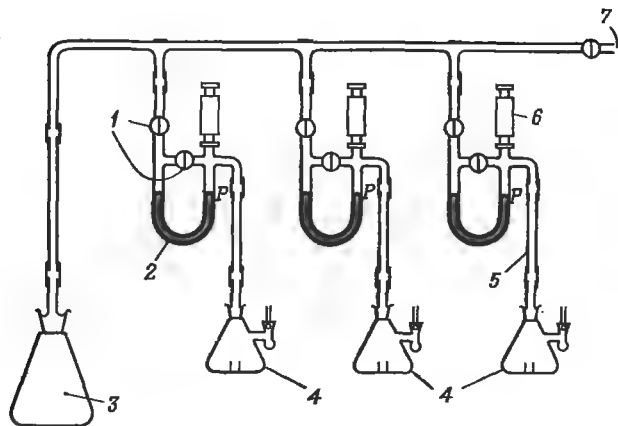


Рис. 8.2. Дифференциальный респирометр Джилсона.

1 — регулировочные винты; 2 — манометрическая жидкость; 3 — контрольная колба; 4 — реакционные сосудики; 5 — гибкая капиллярная трубка; 6 — микрометр; 7 — входное отверстие газопроводной трубки. *P* — точка сравнения.

является V_r . Полный объем сосудика и манометрической трубочки до точки сравнения $V_{\text{полн}}$ можно определить, заполнив это пространство чистой ртутью и рассчитав объем, зная плотность ртути при данной температуре. Тогда $V_r = V_{\text{полн}} - V_{\text{ж}}$. Этот способ калировки прибора является, без сомнения, одним из наиболее точных, однако требует определенных навыков.

Другой подход состоит в том, что в колбе проводят химическую реакцию, сопровождающуюся выделением известного объема газа. Например, добавляют кислоту к бикарбонату натрия (при этом выделяется двуокись углерода) или окисляют гидразин феррицианидом (выделяется азот). Это приводит к определенному изменению уровня манометрической жидкости. Проводя реакцию при различных количествах реагентов, можно прямо откалибровать манометр.

8.4. Дифференциальный респирометр Джилсона

В респирометре имеется до четырнадцати реакционных сосудиков, подобных тем, которые применяются в аппарате Варбурга, и небольшие U-образные капилляры, соединенные с одной и той же контрольной колбой через газопроводную трубку (рис. 8.2). Это устройство позволяет пропускать газ одновременно через все сосудики, однако в то же время накладывает некоторые ограничения при постановке экспериментов, в которых через разные сосудики нужно пропускать различные газовые смеси. Контрольная колба,

имеющая значительно большие размеры, чем сосудики, предназначена для устранения влияния изменений барометрического давления и температуры водяной бани. Следовательно, необходимость в термобарометре, который нужен при манометрии по методу Варбурга, отпадает. К каждой U-образной трубке прикреплен микрометр, прокалиброванный в мкл; с его помощью, перед тем как снимать показания, доводят уровень жидкости в трубке до контрольной отметки. Это обеспечивает регистрацию изменений объема газа при постоянном давлении. Таким образом, изменения объема газа в реакционном сосудике измеряются непосредственно, без предварительной калибровки сосудика и U-образной трубки, хотя полученные данные необходимо привести затем к с.т.д., учитывая давление паров воды внутри сосудика. Еще одно преимущество данного аппарата состоит в том, что U-образные трубки не встраивают, как при методе Варбурга, что значительно облегчает снятие показаний.

8.5. Некоторые практические вопросы манометрии по Джилсону и Варбургу

Подготовка эксперимента и ход работы до некоторой степени зависят от особенностей изучаемой системы и используемой аппаратуры, но в общем виде включают одни и те же основные этапы.

1. Исследуемые материалы (ферменты и субстраты, клеточные органеллы, тканевые срезы, гомогенаты или микроорганизмы и субстраты) помещают в чистый реакционный сосудик в разные его части — боковые отростки, центральный цилиндр и основное отделение сосудика.

2. Если в ходе реакции одновременно происходит и выделение, и поглощение газа (например, дыхание и фотосинтез), выделяющийся газ устраняют химическим путем. Для этого при выделении двуокиси углерода или кислорода в центральный цилиндр наливают соответственно концентрированный раствор щелочи или хлорида хрома. Для увеличения поверхности соприкосновения реагента с газом в центральные цилиндры с поглощающими реагентами помещают небольшие квадратные кусочки фильтровальной бумаги — фитили.

3. Сосудик присоединяют к манометру посредством хорошо смазанного шлифа и закрепляют пружинным зажимом.

4. Затем сосудик помещают в термостатированную водяную баню и открывают кран, сообщающий его с атмосферой.

5. Если атмосфера в сосудике должна отличаться по составу от воздуха, соответствующую газовую смесь пропускают через газовый вентиль и трехходовый кран или через газопроводную трубку.

6. Сосудик уравнивают и встряхивают примерно в течение 10 мин, а затем проверяют герметичность шлифа.

7. Манометрическую жидкость подводят к точке сравнения. При манометрии по Варбургу жидкость в левом колене должна быть на низком уровне, если изучают выделение газа, и на высоком — если изучают его поглощение. Аналогичными соображениями руководствуются при установке микрометра в манометрии по Джилсону.

8. Перекрывают кран, соединяющий сосудик с атмосферой, и продолжают встряхивание еще несколько минут, чтобы удостовериться, что достигнуто равновесие (по постоянству показаний манометра).

9. Прекращают встряхивание и смешивают реагенты, быстро, но плавно наклонив сосудик. Так как при этом приходится вынимать сосудик из водяной бани, он охлаждается, и давление в нем падает, поэтому нужно следить, чтобы манометрическая жидкость не попала в сосудик. При соответствующем навыке смешивание можно выполнить быстро и без осложнений.

10. Возобновляют встряхивание и через определенные промежутки времени снимают показания.

11. При манометрии по Варбургу нужно установить соответствующим образом термобарометр.

Необходимо также иметь в виду следующее.

1. При изучении обмена двуокиси углерода рН реакционной смеси должно быть меньше 5,0, иначе двуокись углерода будет задерживаться в водной фазе в виде бикарбоната. Эти ограничения в отношении рН не относятся к методу Диккенса и Саймера (разд. 8.6.3).

2. Для изучения с помощью манометрии фотосинтеза нужно пользоваться модифицированными респираторами Варбурга или Джилсона. Водяная баня должна быть изготовлена из прозрачного материала (стекло или плексиглас) и окружена электрическими или люминесцентными лампами; для отвода избыточного тепла, создаваемого лампами, применяется электровентилятор и охлаждающий змеевик, помещенный внутрь бани.

3. При изучении метаболической активности срезов тканей, их гомогенатов или клеточных суспензий в отсутствие кислорода создают соответствующие анаэробные условия в экспериментальном сосудике, предварительно пропуская через него свободный от кислорода азот.

4. Экспериментальная ошибка при манометрических измерениях в нормальных условиях составляет, как правило, не менее 5%, а иногда доходит до 10—20%. Как видно из уравнения (8.2), для манометрии по Варбургу количество обменивающегося газа равно произведению h на константу сосудика k . Последняя может быть определена с точностью 0,1%; отсюда следует, что эксперименталь-

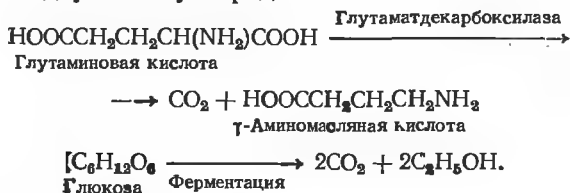
ная ошибка на самом деле определяется точностью, с которой измеряется уровень манометрической жидкости для реакционного сосуда и термобарометра. Точность показаний по шкале составляет не более 0,5 мм; таким образом, общая ошибка одного измерения составляет 1 мм. Относительная ошибка зависит от величины газообмена: чем больше эта величина, тем меньше ошибка. По этой причине количество биологического материала в сосудике стремятся выбрать так, чтобы h была максимально возможной, но при этом скорость газообмена между двумя фазами не превращалась в лимитирующий фактор.

8.6. Применение манометрии

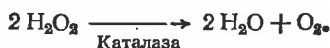
8.6.1. Область применения манометрических методов

Манометрическими методами можно изучать самые разнообразные реакции. Ниже приведены некоторые наиболее характерные примеры.

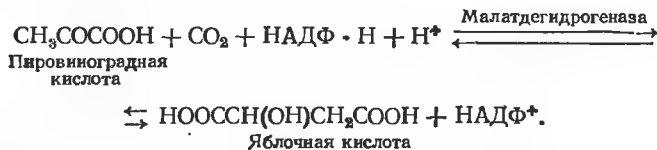
1. Выделение двуокиси углерода



2. Выделение кислорода



3. Поглощение двуокиси углерода



4. Поглощение кислорода

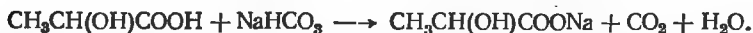


5. Поглощение кислорода и выделение двуокиси углерода



6. Поглощение двуокиси углерода и выделение кислорода

Манометрические методы можно применять также для изучения реакций, при которых не происходит прямого изменения объема газа, но изменяется концентрация ионов водорода. Такой реакцией является, например, реакция ферментативного образования молочной кислоты. Если эту реакцию проводить в присутствии бикарбоната, то на каждую образовавшуюся молекулу молочной кислоты будет приходиться одна молекула углекислого газа, количество которого можно измерить манометрически:



Хотя исходно манометрия применялась для определения изменений содержания двуокиси углерода и кислорода, в принципе ее можно использовать для определения изменений объема любого газа.

8.6.2. Исследования тканевых срезов и гомогенатов

Техника применения срезов тканей животных для исследования метаболизма манометрическим методом была введена Варбургом около 50 лет назад. Она основывается на допущении, что в срезе протекают те же реакции, что и в целом органе. В некоторых случаях такое допущение спорно. В срезе не сохраняется ни иннервации, ни кровоснабжения, а газообмен ограничивается диффузией. Вполне вероятно поэтому, что в толще среза клетки находятся в анаэробных условиях, в то время как клетки поверхностных слоев подвергаются воздействию токсических концентраций кислорода, поскольку обычно в таких экспериментах инкубацию проводят в атмосфере, на 95 % насыщенной кислородом. Кроме того, может сказываться отсутствие некоторых белков и гормонов, обычно содержащихся в крови и влияющих на проницаемость клеток *in vivo*. Как следствие этого некоторые субстраты, возможно, не смогут проникнуть внутрь клеток тканевого среза. Несмотря на все эти ограничения, данный метод оказался необычайно полезным. Ряд перечисленных выше трудностей преодолевают, приготавливая очень тонкие срезы одинаковой толщины (0,2 мм) и помещая их в соответствующую среду. Обычно это растворы Кребса—Рингера, которые по своему ионному составу приближаются к сыворотке крови млекопитающих, что позволяет сохранять целостность исследуемых клеток (разд. 1.7).

Применение гомогенатов тканей вместо срезов частично снимает вопрос о диффузии газа к клеткам и дает возможность работать с

гомогенной средой высокой концентрации, однако в гомогенате доля поврежденных клеток больше, чем в срезе, что в свою очередь является недостатком этой методики. При работе с гомогенатами также необходимо применять изотонические растворы. Тканевые гомогенаты широко используются для изучения процесса метаболизма в мышцах.

Манометрическими методами можно изучать срезы и гомогенаты растительных тканей, равно как корневые чехлики и семена. Если объектом исследования являются листья, следует помнить, что в них наравне с дыханием может происходить и фотосинтез.

8.6.3. Определение дыхательных коэффициентов

Для определения дыхательного коэффициента живых клеток необходимо одновременно измерять поглощение кислорода и выделение углекислого газа. Для этих целей подходят четыре основных манометрических метода.

«Прямой» метод Варбурга. При этом методе используют два реакционных сосудика, в одном из которых (в центральном цилиндрике) имеется щелочь для поглощения двуокиси углерода, и, следовательно, регистрируется потребление кислорода, а в другом щелочь отсутствует, т. е. регистрируется баланс между поглощением кислорода и выделением двуокиси углерода. При использовании респирометра Джилсона последующие расчеты дыхательного коэффициента не представляют сложности; при манометрии по методу Варбурга расчет количества выделившейся двуокиси углерода проводят следующим образом.

Сосудик 1 (с КОН).

Изменение объема обусловлено поглощением кислорода. Если константы сосуда для O_2 и CO_2 обозначить как k'_{O_2} и k'_{CO_2} соответственно, то

$$X_{O_2} = h' k'_{O_2},$$

где h' — изменение показаний манометра, X_{O_2} — объем утилизированного кислорода.

Сосудик 2 (без КОН).

Изменение объема определяется соотношением между объемами поглощенного O_2 и выделившегося CO_2 . Если обозначить константы сосуда как k''_{O_2} и k''_{CO_2} , а наблюдаемые изменения показаний через h'' , то

$$h''_{\text{полн}} = h''_{O_2} + h''_{CO_2} = \frac{X_{O_2}}{k''_{O_2}} + \frac{X_{CO_2}}{k''_{CO_2}}.$$

Отсюда

$$X_{CO_2} = \left(h'' - \frac{X_{O_2}}{k''_{O_2}} \right) k''_{CO_2}, \quad (8.3)$$

или

$$X_{\text{CO}_2} = \left(h'' - \frac{h' k'_{\text{O}_2}}{k''_{\text{O}_2}} \right) k'_{\text{CO}_2}$$

Следует помнить, что суммарные изменения объема газа и соответствующие им показания манометра принято считать отрицательными, т. е. h' отрицательна и отрицательной может быть и h'' . Для иллюстрации рассмотрим следующий конкретный пример.

Пример.

Равные навески срезов тканей печени крысы в буферном растворе поместили в два сосуда Варбурга. В центральный цилиндрик сосуда 1, имеющего константу для кислорода 1,77, добавили щелочь. Константы сосуда 2 для двуокиси углерода и кислорода составляют соответственно 1,86 и 1,42. Показания манометра в начальный момент времени и через 20 мин, а также показания термобарометра приводятся ниже:

Время (мин)	Термобарометр (мм)	Сосудик 1 манометрической жидкости	Сосудик 2 жидкости
0	150,0	236,0	160,0
20	149,7	216,2	153,9

Сосудик 1

Изменение показаний манометра	—19,8 мм
Изменение показаний термобарометра	—0,3 мм
Скорректированное изменение показаний манометра	—19,5 мм
Объем поглощенного кислорода = $19,5 \times 1,77 \text{ мм}^3 = 34,5 \text{ мм}^3$	

Сосудик 2

Изменение показаний манометра	—6,1 мм
Скорректированное изменение показаний манометра	—5,8 мм
Объем выделившегося CO_2 [согласно уравнению (8.3)] =	

$$= \left[-5,8 - \left(\frac{-34,5}{1,42} \right) \right] 1,86 \text{ мм}^3 =$$

$$= (-5,8 + 24,3) 1,86 \text{ мм}^3 =$$

$$= 18,5 \times 1,86 \text{ мм}^3 = 34,4 \text{ мм}^3$$

$$RQ = \frac{34,4}{34,5} = 1,0$$

Так как субстрата не добавляли, то обмен в ткани печени происходил с использованием эндогенных резервов; судя по величине RQ, субстратом обмена был, вероятно, гликоген.

Недостатком этого «прямого» метода Варбурга является то, что полное удаление двуокиси углерода из газовой фазы создает нефизиологические условия, в результате чего может измениться процесс дыхания биологического материала. Такого недостатка лишены «косвенный» метод Варбурга и метод Парди.

«Косвенный» метод Варбурга. Метод основан на том, что изменения объема двух газов с заметно различающейся растворимостью (например, O_2 и CO_2) измеряют одновременно, снимая показания манометров для идентичных реакционных смесей (имеются в виду равные навески тканей) в двух сосудах, значительно отличающихся один от другого по объему жидкости или газа.

Обычно в сосудике 1 отношение объема буфера к объему газа составляет примерно 1:3, а в сосудике 2 — 2:1. Так как навески ткани в обоих сосудах равны, предполагается, что реакции в обоих сосудах можно сопоставлять.

Поскольку CO_2 теперь не поглощается, справедливо уравнение (8.3), т. е.

$$X_{CO_2} = \left(h - \frac{X_{O_2}}{k_{O_2}} \right) k_{CO_2}.$$

Это уравнение применимо к обоим сосудикам.

Сосудик 1

h' — изменение показаний манометра, k'_{O_2} и k'_{CO_2} — константы сосудика для O_2 и CO_2 соответственно.

Таким образом, мы имеем:

$$X_{CO_2} = \left(h' - \frac{X_{O_2}}{k'_{O_2}} \right) k'_{CO_2}. \quad (8.4)$$

Сосудик 2

h'' — изменение показаний манометра,

k''_{O_2} и k''_{CO_2} — соответствующие константы сосудика.

$$X_{CO_2} = \left(h'' - \frac{X_{O_2}}{k''_{O_2}} \right) k''_{CO_2}. \quad (8.5)$$

Вследствие идентичности реакций, протекающих в каждом сосудике, количества поглощенного кислорода (X_{O_2}) и выделившейся двуокиси углерода (X_{CO_2}) должны быть в обоих случаях одинаковыми.

Приравняв правые части уравнений (8.4) и (8.5), получим

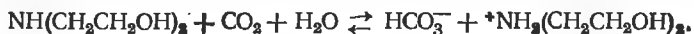
$$\begin{aligned} \left(h' - \frac{X_{O_2}}{k'_{O_2}} \right) k'_{CO_2} &= \left(h'' - \frac{X_{O_2}}{k''_{O_2}} \right) k''_{CO_2}, \\ h' k'_{CO_2} - \frac{X_{O_2}}{k'_{O_2}} k'_{CO_2} &= h'' k''_{CO_2} - \frac{X_{O_2}}{k''_{O_2}} k''_{CO_2}, \\ h' k'_{CO_2} - h'' k''_{CO_2} &= X_{O_2} \left(\frac{k'_{CO_2}}{k'_{O_2}} - \frac{k''_{CO_2}}{k''_{O_2}} \right). \end{aligned}$$

$$X_{O_2} = \frac{h' k'_{CO_2} - h'' k''_{CO_2}}{\left(\frac{k'_{CO_2}}{k'_{O_2}} - \frac{k''_{CO_2}}{k''_{O_2}} \right)}. \quad (8.6)$$

Так как k'_{O_2} , k'_{CO_2} , k''_{O_2} и k''_{CO_2} известны, а h' и h'' измеряются экспериментально, из уравнения (8.6) можно вычислить X_{O_2} . При известном X_{O_2} по уравнению (8.5) можно рассчитать X_{CO_2} .

Метод Диккенса и Саймера. В этом методе как поглощение кислорода, так и общее выделение углекислоты определяются в одном и том же манометрическом сосудике. Потребление кислорода определяют обычным способом, поглощая двуокись углерода щелочью. В конце эксперимента связанную двуокись углерода высвобождают, добавляя к щелочи сильную кислоту. Результирующее изменение показаний манометра соответствует суммарному количеству углекислоты (нужно обязательно учитывать поправку на тепло, выделяющееся при реакции нейтрализации). Количество исходно присутствующей углекислоты определяют с помощью второго, идентичного первому, сосудика, в котором кислоту добавляют до начала эксперимента.

Метод Парди. Этот метод основан на ином способе определения поглощения кислорода в присутствии двуокиси углерода. В центральный цилиндр вместо щелочи помещают углекислый буфер. Этот буфер, способный поддерживать постоянное напряжение двуокиси углерода в газовой фазе, состоит из водного раствора диэтанолamina, который обратимо связывает двуокись углерода:



8.6.4. Определение коэффициентов обмена (метаболических коэффициентов)

Для определения метаболических коэффициентов изучают обмен кислорода и (или) углекислого газа на протяжении некоторого времени. Скорость газообмена непостоянна; она определяется по экспериментальной кривой зависимости объема обмениваемого газа от времени как тангенс угла наклона касательной к любой точке этой кривой. Отсюда, зная количество взятого биологического материала, можно рассчитать коэффициент обмена.

8.6.5. Исследование митохондрий

Манометрию довольно широко применяют при изучении действия различных ингибиторов дыхания. Чаще всего в роли ингибитора выступает цианид; он легко проникает в клетки и ингибирует

определенные ферменты дыхательной цепи, а следовательно, и процесс окислительного фосфорилирования. Синильная кислота является слабой кислотой, и при растворении ее солей в воде образуется преимущественно недиссоциирующая кислота, обладающая летучестью и легко поглощаемая щелочью одновременно с двуокисью углерода. В связи с этим эффективная концентрация цианида в процессе эксперимента изменяется. Во избежание этого в случае необходимости создают постоянное напряжение цианистого водорода с помощью смеси цианида кальция и гидроокиси кальция. Изучение дыхательного контроля и действия различных ингибиторов на дыхание митохондрий, а также измерение отношения P/O [фосфата (Ф), включаемого в АТФ в расчете на каждый атом потребленного кислорода (О)] лучше всего проводить с помощью более чувствительного кислородного электрода (разд. 7.8).

8.6.6. Изучение фотосинтеза

Скорость газообмена водорослей и хлоропластов в ходе фотосинтеза можно легко определить манометрически. Как правило, при этом проводят контрольные опыты в темноте. Парциальное давление одного из газов в ходе эксперимента необходимо поддерживать на постоянном уровне. Для этого можно воспользоваться карбонат-бикарбонатными буферами, поддерживая с их помощью постоянным парциальное давление двуокиси углерода (метод Парди, разд. 8.6.3), или полностью устраняя весь кислород химическим способом. Ценность таких исследований, однако, ограничена, так как известно, что скорость фотосинтетического обмена двуокиси углерода зависит от содержания кислорода в атмосфере.

8.7. Рекомендуемая литература

Sestak Z., Catsky J., Jarvis P. G., Plant Photosynthetic Production — Manual of Methods, Junk, The Hague, 1971. (Подробно рассмотрена манометрия по Варбургу и Джилсону и применение кислородного электрода для изучения фотосинтеза.)

Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F., Monometric in Biochemical Techniques, 5th end, Burgess Publishing Company, Minneapolis, 1972. (Наиболее доступное руководство по манометрическим методам.)

Дополнительная литература

Умбрейт В. В. и др., Манометрические методы изучения тканевого обмена, пер. с англ., ИЛ., М., 1951.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Автолиз 40
- Авторадиография 29, 30, 127, 205, 210
- Агар 115, 119, 122, 123, 133, 134, 137
- Агароза 93, 95
- Адсорбенты 70, 71
- Акриламид, мономер 95, 123
 - N, N'-метиленди-123
 - полимеры 93, 95, 123, 124
- Альфа-частицы 186
- Аминокислотный анализатор 91
- Аминокислоты, анализ 152
 - влияние pH на свойства 21, 22, 118
 - ГЖХ (газожидкостная хроматография) 73
 - ионообменная хроматография 75
 - ТСХ (тонкослойная хроматография) 73
 - электрофорез 114, 118, 121, 122, 133
- Аммония сульфат, осаждение белков 24
 - — удаление диализом 100
- Амперометрическое титрование 238
- Амфолиты 118, 135
- Амфотерные вещества 134
- Анаэробные условия 252
- Анионообменники 87, 88
- Анионы 20, 114, 119, 132, 133
- Антигены 80, 123, 133, 134
- Антистоксовый эффект 165
- Антитела 80, 133, 134
- Аргентация в тонком слое 73
- Аскорбиновая кислота 234

- Баркрофта манометр 247
- Батохромный сдвиг 146
- Белки, аффинная хроматография 100
 - 140
 - буферное действие 19
 - гидролизаты 122, 129, 137
 - иононная точка 23
 - изоэлектрическая точка 23
- Белки, ионный обмен 92
 - колориметрическое определение 152
 - конформационные изменения 63, 162
 - поглощение в ультрафиолетовой области 155
 - проникающая хроматография 99
 - растворимость 24
 - ультрацентрифугирование 64
 - чистота 63
- Бензилвиологен 229, 233
- Бета-частицы 186
- Биоглас 93
- Биогель 93
- Биологические жидкости 27, 170
- Бора магнетон 172
- Брэнстеда и Лоури теория 19, 20
- Бромкрезоловый зеленый 222, 223
 - фиолетовый 223
- Бромтимоловый синий 223
- Буфер (-ный, -ные) 20
 - действие 19
 - емкость 19
 - идеальный 20
 - концентрация 21, 117
 - неоднородный («прерывистый») 131
 - растворы
 - состав 20, 21, 117
 - pH 21, 107, 118, 131, 133, 252

- Варбурга метод «косвенный» 256
 - — «прямой» 255
- Вискинга трубки 110
- Внутренний объем 97
- Водородная лампа 144
- Водородный показатель (pH) буферных растворов 18—21, 114, 117, 131, 134
 - — действие на аминокислоты 19, 21—24, 118
 - — — белки 19, 23
 - — — нуклеиновые кислоты 19

Водородный показатель, действие на пептиды 133
 — — индикаторы 215, 221—224
 Волновое число 143

Газопроточные счетчики 195
 Гамма-излучение 187, 190
 Гейгера—Мюллера
 — разрядные трубки 193—195
 — режим 192
 — счетчик 193
 — — мертвое время 205, 206
 Гель-фильтрация 96, 97
 — агароза 93
 — биогели 93
 — декстран 93
 — полиакриламид 93
 — сефадекс 94, 119
 — сефароза 82, 95
 — тонкослойная 99
 Гемоглобин 19
 Гендерсона—Хассельбальха уравнение 21, 132, 222
 Гидроксония ион (H_3O^+) 118
 Гиперхромный эффект 146
 Гипохромный эффект 146
 Типсохромный сдвиг 146
 Голея элемент 144, 165
 Гомогенизация 35
 — методы 36
 — среда 37
 Градиент плотности, извлечение 51
 — — плавный 50
 — — ступенчатый 50
 — pH 134, 135, 136
 Градиентная элюция 69, 108

Двойной электронно-ядерный резонанс (ДЭЯР) 174
 Двуокись углерода, буфер диэтанолламин 258
 — — задерживание в буферах 252
 — — удаление химическим путем 251
 Дейтериевая лампа 144
 Декстрановый гель (сефадекс) 94
 Денситометр 127
 Детектор азотный 84, 139
 — с захватом электрона (ДЗЭ) 84
 — относительное время удерживания (t_R) 85
 — пламенно-ионизационный 84

Детектор термоионный 84
 Джилсона респирометр 250
 Диализ 111
 Диафильтрация 112
 Диккенса и Саймера метод 258
 Дипольный момент 262
 Дифракционные решетки 164
 Диффузия 89, 117, 122, 126, 127, 134, 135, 136, 248
 2,6-дихлорфенолиидофенол 229, 234
 Диэлектрические постоянные 69
 Дыхания ингибиторы 258

Животных объектов исследования - 26

Заряд электрический 87, 116
 — — отношение к массе 114, 115, 131, 133

Изобестическая точка 158
 Изотахофорез 135
 Изотонические растворы 30
 Изотопного разбавления метод 210
 Изотопный эффект 208
 Изoeлектрические точки (pI) аминокислот 22, 134
 — — белков 24, 134
 Иммуноглобулины 133
 Иммуноэлектрофорез 133
 Индикаторы 215, 221, 225, 232
 Интерференционные фильтры 164
 Ионизационная камера 191
 Ионизация аминокислот 21, 90, 118
 — белков 23
 — радиоактивными частицами 189

Калия феррицианид 229, 234
 Камера высокого давления 40
 Каналов отношения метод 202
 Каротиноиды 73, 76, 140
 Катионообменники 87
 Катионы 114, 119
 Квантовый выход 159
 Кислоты и основания 19, 20
 — — по номенклатуре Бёрнстеда и Лоури 20
 — — связь pK_a и pK_b 21

Кислоты и основания, титрование 222

Клетки, культура 33, 34

— мембраны 18, 19, 27, 130

— органеллы 18, 31, 57, 130

— разрушение 38

— фракционирование 35

— частицы 18

Клистронный осциллятор 172

Коллектор фракций 109

Колориметрия 152, 153

Комптоновское рассеяние 191

Кребса—Рингера раствор 31, 254

Крезоловый красный 223

Культура

— клеток 33

— микроорганизмов 35

— протопластов 35

— тканей 33

Кюветы 149

Кюри, единицы 189

Лазеры 166

Лакмус 223

Ламберта—Бэра закон 145

Магнитный момент 171, 174

Макромолекулы, конформационные изменения 63

— концентрирование растворов

гель-фильтрацией 100

— — — диализом 111

— — — ультрафильтрацией 111,

112

— чистота препаратов

Манометрия 252, 253

— по Варбургу 247, 251

— по Джилсону 247, 250

— дифференциальная 247

— при постоянном давлении 247

— при постоянном объеме 246

— принципы 246, 255—258

Масс-спектрометрия 178

— оборудование 179

— применение 181

— спектры 179

Массовое число 185

Мембраны 19, 110, 130

— полупроницаемые 110

— целлюлозные 110, 111

Метаболический коэффициент 246, 258

Метилвиологен 229, 233

Метиленовый синий 229, 232M

Метилоранж 223

Метилумбеллиферон 162

Митохондрии, дыхание 241, 258

— НАД·Н окисление 230

— «прочно сопряженные» 242

— разностные спектры 156

— «разобщенные» 242

Молекулярный вес

— — — определение методом масс-спектрометрии 178

— — — приближения к седиментационному равновесию 62

— — — — проникающей хроматографии 99, 100

— — — — седиментационного равновесия 62

— — — — по скорости седиментации 61

Молекулярные сита 92

Монохроматоры 148—168

— обратная линейная дисперсия 148

— спектральная ширина щели 148

— ширина полосы 148

— с дифракционной решеткой 148, 149, 164

— — — — линейное разрешение 149

Негатрон 186, 190

Нейтральный красный 223

Нейтрино 190

Нефелометрия 158

Нуклеиновые кислоты, аффинная хроматография 140

— — — колориметрическое определение 152

— — — конформационные изменения 63

— — — поглощение в ультрафиолетовой области 155

— — — проникающая хроматография 99

— — — противоточное распределение 79

— — — ультрацентрифугирование 62, 63

— — — чистота препаратов 63

— — — электрофорез 122, 137

Нуклеотиды, колориметрическое определение 152

— разделение 122, 136, 140

Обессоливание 100

Обугливание 167

- Окислительно-восстановительное титрование 230
 Окислительно-восстановительные индикаторы 215, 230, 232
 — — пары 228
 — — потенциалы 214, 228
 Окрашивания методы 71, 126, 127
 Олигопептиды, определение аминокислотной последовательности 182
 Ома закон 116
 Оптическая плотность 145
 Оптический путь 145, 149
 Органа срезы 32, 254
 Отпечатков пальцев метод 122, 129, 137, 163
 Охлаждающие системы 117, 120, 128, 129
- Парди метод 258
 Парциальный удельный объем 62
 Перфузия 16
 Пламя 167, 168
 Поглощение воды гелями 94
 — света 145
 Полураспада период (время) 187, 188, 206
 Полые волокна 110, 111
 Полярография 215, 235
 Потенциометрия, методы 214
 — титрование 230
 Прecipитация 134
 Призмы 148, 164
 Пропорциональный счетчик 193
 Пропускание света 145
 Протонный магнитный резонанс 175
 Протопласты 35
 рН-метры 219, 226
 рН-статы 224
- Радиоактивность 189—191, 205, 206, 212
 — взаимодействие с веществом 189
 — измерение 191—207
 — — абсолютный и относительный подсчеты распадов 191
 — фон 205
 Радиоактивные метки, применение 208—212
 Радиоактивный распад 186—188
 — — возбуждение и ионизация атомов 189
- Радиоактивный распад, период полураспада 188
 — — применение в биологии 208
 Радиоизотопы 185
 Радиочастоты 144, 175
 Распределения коэффициент эффективный 65
 Растворители 70, 74, 75
 Растительных объектов исследование 33
 Роторы Андерсона (зональные) 53
 — непрерывного действия 53
 — с подвесными стаканами 52
 — угловые 53
- Самопоглощение 206
 Сведберга уравнение 61
 — единицы 61
 Сверхтонкое расщепление 172
 Свин-электромагнит 176
 Седиментация 61, 62
 Силанизация 86
 Смоли ионообменные 87
 — набухание 89
 Спектроскопические методы 141, 182, 183
 Спектроскопического расщепления фактор 172
 Спектрофлуориметрия 159—162
 Спектрофотометрия в видимой и ультрафиолетовой областях 146
 — инфракрасная 162—165
 — пламенная 166
 — — абсорбционная атомная 167, 169, 170
 — — высвобождающие агенты 166
 — — газовые смеси 168
 — — флуоресцентная атомная 171
 — рамановская 165
 Спектрофотометры 151—153
 Спектры атомные 144, 166
 — — флуоресцентные 171
 — видимые 143, 144
 — возбуждения 160
 — вращательные 143
 — действия 158
 — инфракрасные 162
 — колебательно-вращательные 144
 — линейчатые 143
 — масс- 178
 — молекулярные 143
 — натрия 166
 — поглощения 143
 — полосатые 143
 — разностные 156

Спектры рамановские 165
 — убихинола, убихинона 156
 — ультрафиолетовые 143, 144
 — флуоресценции 159
 — электронные 144
 — ЭПР 173
 — ЯМР 176
 Спин, метка 174
 — электронов 171
 — ядер 174
 Спин-решеточное взаимодействие 172
 Спин-спиновое взаимодействие 176
 Среда питательная 34, 35
 — суспендирования 37
 Стандартное отклонение относительное 207
 Стоксов сдвиг 159
 Субклеточных фракций анализ 56
 Сцинтилляционный счет 195—200
 — счетчик 127, 195

Таундсена лавинный эффект 192
 Теоретические тарелки 83
 Термобарометр 249
 Термопар батарея 165
 Тетразолиевые красители 232, 233
 Турбидиметрия 158
 Турнберга пробирки 232
 Тушение флуоресценции 161, 184
 — в счетчике Гейгера—Мюллера 193

Углеводы, определение 152
 — хроматография 86
 — электрофорез 117, 136
 Ультрафильтрация 111

Фаза газовая 81
 — жидкая 60, 80, 81
 — избирательная 81
 — неподвижная 66, 82
 — обращенная 76
 — подвижная 66, 81
 — твердая 66
 Феназинметосульфат 229, 234
 Феноловый красный 223
 Фенолфталеин 223
 Ферменты, количественное определение 155, 156
 — НАД·Н- и НАДФ·Н-зависимые реакции 156, 161

Ферменты, определение манометрическое 253
 — — флуорометрическое 161
 — — группоспецифические гидролитические ферменты 161
 Флуориметрия 159—161
 Флуорофор 196
 Фотоионизация 179
 Фотосинтеза изучение 242, 259
 Фотоэлементы 150, 155

Химический сдвиг 175, 176
 Химической связи деформация 162
 Хлоропласты, перенос электронов 230, 232, 234, 242
 Хроматография адсорбционная 68, 118
 — аффинная 100, 101
 — на бумаге 74, 121, 125, 126
 — восходящая 75
 — под высоким давлением 105
 — газожидкостная 81
 — двухмерная 71
 — ионообменная 87, 139, 140
 — на колонке 68, 105
 — нисходящая 75
 — с обращенной фазой 76
 — препаративная 72, 86
 — применение 79, 99, 104, 140
 — принципы 65, 68, 74, 77, 81, 87, 92, 100, 110
 — проникающая 92
 — противоточная (протнвоточное распределение) 77
 — распределительная 74
 — тонкослойная 70
 — фильтрование через стекло с заданным размером пор 93
 Хроматическая абберрация 147
 Хромофор 153

Цвиттерионы аспарагиновой кислоты 22, 133
 — глицина 133
 — лизина 23
 Целлюлоза 92
 Центрифуги аналитические 59
 — высокоскоростные 52
 — общего назначения 52
 — препаративные 52
 Центрифугирование
 — аналитическое 59
 — дифференциальное 45

- Центрифугирование зональное 47, 48
 — изопикническое 48
 — препаративное 44, 51, 52
 — применение 45, 61
 — принципы 42
 Цианид 258, 259
 Циклический анализ 166
- Черенкова счетчик 204
 Черного тела излучение 164
- Эксклюзии пределы 95, 96
 Экстинкции коэффициент 145
 Электродиализ 112
 Электрод водородный 215, 216, 228
 — из нержавеющей стали 119
 — ион-селективный 215, 216, 227
 — каломельный 216, 217, 225, 227, 235
 — капельный ртутный 235
 — кислородный 239
 — Кларка 240, 242
 — платиновый 119, 228, 235, 237
 — Рэнка 240
 — стандартный 215, 216, 228
 — стеклянный 215, 217, 218, 223
 — хингидронный 217
 — хлорсеребряный 217, 220, 228
 Электролиз 114
 Электромагнитное излучение 141, 144
 Электрометрические методы 214, 217
 Электронвольт 187
 Электронная бомбардировка 179
 Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) 171, 172
 — — — применение 173
 Электроосмос (электроэндоосмос) 118, 119, 121, 122
 Электрофорез 114
 — на агаре 115, 119, 123, 133, 134
 — на ацетате целлюлозы 121, 122
 — блоки электрофоретические 119
 — бумажный 121
 — вертикальный 120
 — в крахмальном геле 122, 134, 137
 — — полиакриламидном геле 123
 — высоковольтный 127
 — горизонтальный 120
 — двухмерный 122, 129
 — диск- 131
 — зональный 115, 134
 — изотахофорез 135
 — изоэлектрическое фокусирование 134
 — иммуно- 133, 134
 — непрерывный (проточный) 129
 — носители 121
 — оборудование 119
 — подвижной границы метод 115
 — препаративный 110, 136
 — прерывистый 131
 — применение 136
 — проточный 129
 — тонкослойный 122
 — ход работы 124
 Электрохимический элемент 214
 Эмиссия 166
 Энергии уровень 142, 143
- Ядерный магнитный резонанс, ЯМР-спектроскопия 174—177

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие к русскому изданию	5
Предисловие к английскому изданию	7
От составителей	9
Принятые сокращения	13
Единицы системы СИ (Международной системы единиц)	13
Множители и приставки для образования десятичных и дольных единиц	14
Единицы объема	14
Перевод общепринятых единиц в единицы системы СИ	15
Некоторые физические постоянные в единицах системы СИ	15
 <i>Часть I. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ</i>	 17
 <i>Глава 1. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ БИОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ</i>	 17
1. 1. Введение	17
1. 2. pH среды и буферные растворы	18
1. 3. Подходы к биохимическому исследованию	24
1. 4. Исследования на уровне целого организма	26
1. 5. Изотонические солевые растворы	30
1. 6. Перфузия изолированных органов	31
1. 7. Приготовление срезов органов и тканей	32
1. 8. Использование растительного материала	33
1. 9. Культуры тканей и клеток	33
1.10. Фракционирование клеток	35
1.11. Рекомендуемая литература	41
 <i>Часть II. МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ</i>	 42
 <i>Глава 2. ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ (Э. Гриффитс)</i>	 42
2. 1. Принцип метода	42
2. 2. Препаративное центрифугирование	45
2. 3. Формирование и извлечение градиентов	49
2. 4. Препаративные центрифуги и их применение	51
2. 5. Конструкция роторов	52
2. 6. Анализ субклеточных фракций	56
2. 7. Фракционирование методом дифференциального центрифугирования. Оформление результатов	58

2. 8. Аналитическое ультрацентрифугирование	59
2. 9. Применение аналитического ультрацентрифугирования . . .	61
2.10. Рекомендуемая литература	64
Глава 3. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ (Б. Уильямс и К. Уилсон)	65
3. 1. Общие принципы хроматографии	65
3. 2. Адсорбционная хроматография	68
3. 3. Распределительная хроматография	74
3. 4. Противоточное распределение	77
3. 5. Газожидкостная хроматография	81
3. 6. Ионообменная хроматография	87
3. 7. Проникающая хроматография	92
3. 8. Аффинная хроматография	100
3. 9. Жидкостная хроматография под высоким давлением	105
3.10. Общие приемы хроматографии на колонке	105
3.11. Разделение веществ с помощью мембран и полых волокон .	111
3.12. Рекомендуемая литература	112
Глава 4. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ (М. Дэвис и А. Симпкинс)	114
4.1. Введение	114
4.2. Факторы, влияющие на подвижность	116
4.3. Общие методы	119
4.4. Специальные электрофоретические методы	127
4.5. Применение электрофореза	136
4.6. Рекомендуемая литература	137
ДОПОЛНЕНИЕ К ЧАСТИ II	138
Часть III. АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ	141
Глава 5. СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ (Д. Бэррин)	141
5. 1. Основные принципы	141
5. 2. Спектрофотометрия в видимой и ультрафиолетовой областях	146
5. 3. Спектрофлуориметрия	159
5. 4. Инфракрасная спектрофотометрия	162
5. 5. Спектроскопия комбинационного рассеяния (рамановская спектрофотометрия)	165
5. 6. Пламенная спектрофотометрия	166
5. 7. Электронный парамагнитный резонанс	171
5. 8. Ядерный магнитный резонанс	174
5. 9. Масс-спектрометрия	178
5.10. Сводная таблица спектроскопических методов	182
5.11. Рекомендуемая литература	183
Глава 6. РАДИОИЗОТОПНЫЕ МЕТОДЫ (К. Гоулдинг)	185
6.1. Природа радиоактивности	185
6.2. Регистрация и измерение радиоактивности	191
6.3. Определение радиоактивности на практике и анализ данных	205
6.4. Преимущества применения радиоактивной метки	207
6.5. Применение радиоизотопов в биологических исследованиях	208
6.6. Вопросы техники безопасности	212
6.7. Заключение	213
6.8. Рекомендуемая литература	213

Глава 7. ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИЕ, ЭЛЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ И ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ (М. Дженкинс)	214
7. 1. Введение	214
7. 2. Стандартный водородный электрод	215
7. 3. Электроды сравнения	216
7. 4. Измерение рН	217
7. 5. Ион-селективные электроды	226
7. 6. Окислительно-восстановительные потенциалы	228
7. 7. Полярография	235
7. 8. Кислородный электрод	239
7. 9. CO_2 -чувствительный электрод	242
7.10. Рекомендуемая литература	243
Глава 8. МАНОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ (К. Уилсон)	245
8.1. Введение	245
8.2. Виды манометрии	246
8.3. Манометр Варбурга (манометр постоянного объема)	247
8.4. Дифференциальный респирометр Джилсона	250
8.5. Некоторые практические вопросы манометрии по Джилсону и Варбургу	251
8.6. Применение манометрии	253
8.7. Рекомендуемая литература	259
Предметный указатель	260

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:
129820, Москва, И-110, ГСП
1-й Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир».

ИБ № 1412

**МЕТОДЫ
ПРАКТИЧЕСКОЙ
БИОХИМИИ**

Редактор Н. Шафрановская
Художник М. Мерзиевский
Художественный редактор Л. Наумов
Технический редактор Н. Панфилова
Корректор Л. Панова

Сдано в набор 10.06.77. Подписано к печати 22.02.78. Формат 60×90^{1/16}. Бумага тип. № 2 Литературная гарнитура. Высокая печать 8,5 бум. л., 17 печ. л., Уч.-изд. л. 16,87. Зак. 502. Цена 1 руб. 40 коп.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Ярославский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном комитете Совета Министров СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.
150014, Ярославль, ул. Свободы, 97.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

Выйдет в свет в 1978 году

Уотсон Дж. Молекулярная биология гена, перевод с английского, 46 л.

Книга, принадлежащая перу лауреата Нобелевской премии Дж. Уотсона, занимает особое место в литературе по молекулярной биологии. Она является превосходным руководством в этой новой, бурно развивающейся области биологии и суммирует самые современные данные. Рассмотрены принципы хромосомной теории наследственности, взаимодействия биологически активных молекул, структура и механизмы функционирования нуклеиновых кислот, их роль в биосинтезе белка, структура и функция мембран, роль различных регуляторов обмена веществ, вирусная теория рака, вопросы и задачи генной инженерии. Книга написана исключительно четко, логично и читается с большим интересом.

Предназначена для биологов разных специальностей (молекулярных биологов, биохимиков, биофизиков, генетиков, цитологов, вирусологов, микробиологов), а также для студентов и преподавателей соответствующих специальностей.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

Выйдет в свет в 1979 году

Корниш-Бовден Э. Основы ферментативной кинетики, перевод с английского, 13 л.

Значительные успехи энзимологии, достигнутые в последние годы, позволили выяснить многие механизмы, лежащие в основе работы ферментов. В известной степени эти успехи связаны с разработкой методов анализа сложных кинетических параметров, характеризующих скорость ферментативных реакций и описывающих взаимодействие ферментов с аллостерическими эффекторами. В книге известного английского ученого изложены основные принципы, понимание которых позволяет понять более сложные случаи кинетики ферментативных реакций. Рассмотрены методы вывода уравнений скорости ферментативной реакции, действие активаторов и ингибиторов, влияние рН и температуры на скорость реакций, особенности кинетики аллостерических ферментов.

Книга рассчитана на биохимиков и химиков, в том числе студентов и аспирантов.